



UNIVERSITÀ DI PISA
DIPARTIMENTO DI FARMACIA

**Corso di Laurea Specialistica in
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche**

Tesi di Laurea:

**Produzione di metaboliti secondari in piante di
Bituminaria bituminosa L. elicitate con micorrize**

Relatore:

Prof.ssa Luisa Pistelli

Dott.ssa Laura Pistelli

Correlatore:

Prof.ssa Manuela Giovannetti

Candidata:

Virginia Ulivieri

Anno Accademico 2012 – 2013

[Digitare il testo]

Alla mia Famiglia

INDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Bituminaria bituminosa L. | 14 |
| 1.1. Inquadramento sistemico | 14 |
| 1.2. introduzione | 15 |
| 1.3. Descrizione botanica di Bituminaria bituminosa L. | 16 |
| 1.4. Distribuzione geografica | 18 |
| 2. Fitochimica del genere Psoralea..... | 19 |
| 2.1. Principali metaboliti secondari | 19 |
| 2.1.1. Furanocumarine | 19 |
| 2.1.2. Flavonoidi e derivati | 21 |
| 2.1.3. Isoflavonoidi..... | 23 |
| 2.1.4. Pterocarpani..... | 25 |
| 2.1.5. Terpeni | 26 |
| 2.1.6. Derivati dell'acido idrossicinnamico | 28 |
| 2.2. Composti volatili nel genere psoralea..... | 29 |
| 2.3. Studi fitochimici su Bituminaria bituminosa L. | 31 |
| 3. Vie biosintetiche dei principali metaboliti presenti in Bituminaria bituminosa | 40 |
| 3.1. I derivati fenolici | 40 |
| 3.1.1. Biosintesi dell'acido shikimico | 40 |
| 3.1.2. Sintesi dell'acido corismico e degli aminoacidi aromatici | 41 |
| 3.1.3. Sintesi degli acidi cinnamici..... | 43 |
| 3.1.4. Biosintesi delle cumarine e dei loro derivati | 44 |
| 3.1.5. Biosintesi degli isoflavonoidi e degli pterocarpani..... | 46 |
| 3.2. I terpeni | 49 |

| | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1. | Sintesi dei monoterpeni presenti in B.bituminosa | 50 |
| 3.2.2. | Sintesi dei sesquiterpeni presenti in B.bituminosa | 53 |
| 4. | UTILIZZO DI Bituminaria bituminosa IN MEDICINA | 56 |
| 4.1. | Utilizzo in medicina popolare del genere Psoralea..... | 56 |
| 4.2. | Attività farmacologica del genere Psoralea..... | 57 |
| 4.3. | Attività farmacologica dei metaboliti di Bituminaria bituminosa | 62 |
| 5. | LA SIMBIOSI MICORRIZICA..... | 64 |
| 5.1. | Le simbiosi micorriziche..... | 64 |
| 5.1.1. | Le micorrize arbuscolari | 66 |
| 5.1.2. | I funghi micorrizici arbuscolari | 67 |
| 5.1.3. | Piante ospiti | 68 |
| 5.1.4. | Ciclo biologico | 69 |
| 5.2. | Rapporti fungo-pianta: gli effetti dei funghi AM | 72 |
| 5.2.1. | Traslocazione di C al fungo..... | 72 |
| 5.2.2. | Traslocazione di nutrienti alla pianta | 72 |
| 5.2.3. | Effetti non nutrizionali dei funghi AM | 73 |
| 5.3. | Effetti della simbiosi micorrizica sulla produzione di metaboliti secondari in piante medicinali | 76 |
| 5.3.1. | Effetto della simbiosi micorrizica sui terpeni e sui loro derivati | 76 |
| 5.3.2. | Effetto della simbiosi micorrizica sui composti fenolici..... | 77 |
| 6. | SCOPO DEL LAVORO | 79 |
| 7. | MATERIALI E METODI | 80 |
| 7.1. | Materiali e metodi per lo studio degli estratti..... | 80 |
| 7.1.1. | Metodo Cromatografico | 80 |
| 7.1.2. | Spettrofotometria UV-vis..... | 81 |
| 7.2. | Materiale e metodi per lo studio dei composti volatili..... | 81 |
| 7.2.1. | Analisi Solid Phase Micro-Extraction (SPME) | 81 |
| 7.2.2. | GC-MS..... | 83 |

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.2.3. | Calcolo degli Indici di Kovats | 84 |
| 8. | PARTE SPERIMENTALE..... | 85 |
| 8.1. | Materiale vegetale | 85 |
| 8.2. | Sterilizzazione dei semi | 85 |
| 8.3. | Semina | 86 |
| 8.4. | Preparazione dei terreni | 86 |
| 8.4.1. | Preparazione del terreno sabbioso sterile..... | 87 |
| 8.4.1.1. | Inoculo batterico | 87 |
| 8.4.2. | Inoculo micorrizico..... | 87 |
| 8.5. | Trasferimento delle piantine di Bituminaria bituminosa | 88 |
| 8.6. | Rilievi morfologici | 88 |
| 8.7. | Prelievo delle piante e radici | 88 |
| 8.8. | Colorazione delle radici e determinazione della colonizzazione radicale dei funghi AM | 89 |
| 8.9. | Analisi dei cataboliti | 89 |
| 8.9.1. | Determinazione di clorofilla a,b, totale e carotenoidi | 89 |
| 8.9.2. | Determinazione e quantizzazione dei Flavonoidi totali, Polifenoli totali e del Potere antiossidante | 90 |
| 8.9.2.1. | Estrazione metanolica di foglie e radici | 90 |
| 8.9.2.2. | Determinazione e quantizzazione dei Flavonoidi totali | 91 |
| 8.9.2.3. | Determinazione e quantizzazione dei Polifenoli totali..... | 92 |
| 8.9.2.4. | Determinazione del Potere antiossidante | 92 |
| 8.9.3. | Ricerca e determinazione di pterocarpani, isoflavonoidi, furanocumarine e plicatina B | 94 |
| 8.9.3.1. | Macerazione ed Estrazione cloroformica del materiale vegetale | 94 |
| 8.9.3.2. | Preparazione di soluzioni a concentrazione nota degli estratti per analisi HPLC..... | 95 |
| 8.9.3.3. | Determinazione degli Pterocarpani ed Plicatina B | 98 |
| 8.9.3.4. | Determinazione di furanocumarine e daidzeina o genisteina | 98 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.10. Frazione volatile | 100 |
| 8.10.1. Determinazione dei composti volatili nelle foglie di B. bituminosa..... | 100 |
| 9. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 101 |
| 9.1. Colonizzazione radicale dei funghi AM | 101 |
| 9.2. Rilievi morfologici | 102 |
| 9.2.1. Numero ed area delle foglie | 102 |
| 9.2.2. Numero e lunghezza degli steli | 103 |
| 9.3. Determinazione di clorofilla e dei carotenoidi | 107 |
| 9.4. Determinazione dei Flavonoidi totali | 108 |
| 9.5. Determinazione dei polifenoli totali | 110 |
| 9.6. Potere antiossidante | 111 |
| 9.7. Determinazione degli pterocarpani..... | 113 |
| 9.7.1. Erybraidina C | 113 |
| 9.7.2. Bitucarpina A | 114 |
| 9.8. Determinazione del derivato dell'acido idrossicinnamico | 117 |
| 9.8.1. Plicatina B | 117 |
| 9.9. Determinazione delle furanocumarine | 119 |
| 9.9.1. Psoralene | 119 |
| 9.9.2. Angelicina | 122 |
| 9.10. Determinazione dell' isoflavonoide..... | 124 |
| 9.10.1. Genisteina..... | 124 |
| 9.11. Composti volatili | 125 |
| 10. CONCLUSIONI..... | 131 |

INDICE DELLE FIGURE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Pianta di <i>Bituminaria bituminosa</i> | 15 |
| Figura 2 Pianta di <i>Bituminaria bituminosa</i> | 16 |
| Figura 3 Foglie e fiori di <i>Bituminaria bituminosa</i> | 16 |
| Figura 4 Fiore di <i>Bituminaria bituminosa</i> | 17 |
| Figura 5 Frutto di <i>Bituminaria bituminosa</i> | 17 |
| Figura 6 Seme di <i>Bituminaria bituminosa</i> | 17 |
| Figura 7 Distribuzione geografica di <i>Bituminaria bituminosa</i> | 18 |
| Figura 8 Struttura molecolare psoralene ed angelicina | 20 |
| Figura 9 Struttura molecolare del bacucalcone..... | 21 |
| Figura 10 Struttura molecolare isobavacalcone | 22 |
| Figura 11 Struttura molecolare bavacromanolo e psoralidina | 22 |
| Figura 12 Struttura chimica bavachinina, bavachina, isobavachina | 22 |
| Figura 13 Struttura molecolare corilifolina | 23 |
| Figura 14 Struttura molecolare daidzeina e genisteina | 24 |
| Figura 15 Struttura molecolare psoralenolo | 24 |
| Figura 16 Struttura molecolare 8-prenildaideina | 24 |
| Figura 17 Struttura molecolare neobavaisoflavone | 25 |
| Figura 18 Struttura molecolare corilina | 25 |
| Figura 19 Struttura chimica di bitucarpina A ed eribraedina C | 26 |
| Figura 20 Struttura molecolare morisianina | 26 |
| Figura 21 Struttura molecolare bacuchiolo | 27 |
| Figura 22 Struttura chimica delle plicatina B | 28 |
| Figura 23 Struttura chimica Plicatina A..... | 28 |
| Figura 24 Struttura molecolare β -myrcene..... | 29 |
| Figura 25 Struttura molecolare β -cariofillene, α -umulene e germacrene D | 29 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 26 Struttura molecolare cariofillene ossido | 30 |
| Figura 27 Struttura molecolare E-cariofillene | 30 |
| Figura 28 Struttura molecolare (+)-aromadendrene..... | 30 |
| Figura 29 Struttura chimica di bitucarpina B | 32 |
| Figura 30 Struttura chimica β -sitosterolo e β -sitosterolo 3-O-glucoside | 32 |
| Figura 31 Struttura molecolare β -farnesene | 34 |
| Figura 32 Struttura molecolare δ -cadinene | 35 |
| Figura 33 Struttura molecolare γ -muurulene..... | 35 |
| Figura 34 Struttura molecolare α -copaene | 35 |
| Figura 35 Struttura molecolare triciclene | 35 |
| Figura 36 Struttura molecolare α -pinene..... | 36 |
| Figura 37 Struttura molecolare camfene | 36 |
| Figura 38 Struttura molecolare β -pinene..... | 36 |
| Figura 39 Struttura molecolare β -ocimene | 36 |
| Figura 40 Struttura molecolare (Z,Z)-9,12-octadecadien-1-ol | 36 |
| Figura 41 Struttura molecolare (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrien-1-ol..... | 37 |
| Figura 42 Struttura chimica del 3-hexen-1-ol..... | 37 |
| Figura 43 Struttura molecolare 1-octen-3-ol | 37 |
| Figura 44 Struttura molecolare linalolo | 37 |
| Figura 45 Struttura molecolare 4-terpineolo | 37 |
| Figura 46 Struttura molecolare α -terpineolo | 38 |
| Figura 47 Struttura molecolare geraniolo..... | 38 |
| Figura 48 Struttura molecolare E-antetolo | 38 |
| Figura 49 Struttura molecolare timolo | 39 |
| Figura 50 struttura molecolare n-eptanale..... | 39 |
| Figura 51 struttura molecolare n-nonale | 39 |
| Figura 52 Struttura molecolare spatunelolo | 39 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 53 formazione dell'acido shikimico | 41 |
| Figura 54 Sintesi acido corismico..... | 42 |
| Figura 55 Sintesi dell'acido pterfenico | 42 |
| Figura 56 Formazione di L-fenilalanina e L-tirosina | 43 |
| Figura 57 Sintesi acido p-cumarico | 44 |
| Figura 58 Sintesi delle cumarine | 45 |
| Figura 59 Isomerizzazione trans-cis dell'acido 2-4-diidrossicinnamico | 45 |
| Figura 60 Sintesi psoralene ed angelicina | 46 |
| Figura 61 Sintesi dello psoralene a partire dalla marmesina | 46 |
| Figura 62 Sintesi dei calconi e dei flavanoni..... | 47 |
| Figura 63 Sintesi degli isoflavoni a partire dai flavonoidi | 48 |
| Figura 64 Sintesi daidzeina e genisteina | 48 |
| Figura 65 Unità isoprenica | 49 |
| Figura 68 Sintesi monoterpeni ciclici | 51 |
| Figura 69 Sintesi dei principali monoterpeni | 51 |
| Figura 70 Sintesi dei principali monoterpeni presenti in <i>B.bituminosa</i> | 52 |
| Figura 71 Sintesi farnesil pirofosfato (FPP)..... | 53 |
| Figura 72 Configurazioni possibili del FPP | 53 |
| Figura 73 Formazione dei principali cationi da cui originano i sesquiterpeni..... | 54 |
| Figura 74 Sintesi del germacrene..... | 55 |
| Figura 75 Sintesi dell'umulene..... | 55 |
| Figura 76 Illustrazione tecnica SPME..... | 82 |
| Figura 77 GC-MS | 83 |
| Figura 78 Isola d'Elba..... | 85 |
| Figura 79 Semina su Grodan | 86 |
| Figura 80 Complesso flavonoide alluminio cloruro..... | 91 |
| Figura 81 Complesso [Fe(III)-(TPTZ) ₂] ³⁺ | 93 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 82 Percentuale della colonizzazione radicale..... | 101 |
| Figura 83 Immagine al microscopio della micorrizzazione radicale | 101 |
| Figura 84 T0 Trasferimento in vaso (NM- IMA5-ELBA) di piantine di <i>B.bituminosa</i> | 104 |
| Figura 85 T45 <i>B.bituminosa</i> al 45° giorno | 104 |
| Figura 86 T60 <i>B.bituminosa</i> 60° giorno..... | 105 |
| Figura 87 T90 <i>B.bituminosa</i> 90° giorno..... | 105 |
| Figura 88 T90 <i>B.bituminosa</i> 90° giorno trasferimento in serra | 106 |
| Figura 89 Principali classi chimiche SPME foglie di <i>B. bituminosa</i> (IMA5) | 125 |
| Figura 90 Principali classi chimiche SPME foglie di <i>B. bituminosa</i> (ELBA)..... | 126 |
| Figura 91 Principali classi chimiche SPME foglie di <i>B. bituminosa</i> (NM)..... | 126 |

INDICE DELLE TABELLE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabella 1 Equazione di regressione lineare e rispettivi coefficienti di correlazione periodo vegetativo | 94 |
| Tabella 2 Equazione di regressione lineare e rispettivi coefficienti di correlazione periodo riproduttivo..... | 94 |
| Tabella 3 Peso totale estratto cloroformico di foglie e fiori (mg)..... | 96 |
| Tabella 4 Peso totale estratto cloroformico radici | 96 |
| Tabella 5 mg di estratto cloroformico di foglie e fiori utilizzati per ottenere soluzioni a concentrazione nota | 97 |
| Tabella 6 mg di estratti cloroformico di radici per ottenere soluzioni metanoliche a concentrazione nota | 97 |
| Tabella 7 Equazioni e coefficienti di correlazione per la determinazione dei metaboliti secondari in <i>B. bituminosa</i> | 99 |
| Tabella 8 Tempi di ritenzione ed assorbanza dei metaboliti ricercati in <i>B.bituminosa</i> | 99 |
| Tabella 9 Variazione del numero di foglie in relazione ai tre trattamenti utilizzati..... | 102 |
| Tabella 10 Variazione area foglie in base ai tre trattamenti utilizzati. Risultati medie di tre replicati \pm SD | 102 |
| Tabella 11 Variazione numero di steli in relazione ai tre trattamenti utilizzati | 103 |
| Tabella 12 Variazione della lunghezza degli steli in relazione ai tre trattamenti utilizzati. Risultati medie di tre replicati \pm SD | 103 |
| Tabella 13 PERIODO VEGETATIVO Determinazione di clorofilla e carotenoidi in relazione ai tre trattamenti utilizzati. | 107 |
| Tabella 14 PERIODO RIPRODUTTIVO Determinazione clorofilla e carotenoidi in relazione ai tre trattamenti utilizzati. Risultati medie tre replicati \pm SD..... | 108 |
| Tabella 15 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO contenuto di flavonoidi totali in estratto metanolico | 108 |
| Tabella 16 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO contenuti flavonoidi totali in estratto metanolico | 109 |
| Tabella 17 Contenuto di flavonoidi totali in radici di <i>B.bituminosa</i> fine periodo | 109 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabella 18 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO contenuto di polifenoli totali in estratto metanolico di <i>B.bituminosa</i> | 110 |
| Tabella 19 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO Contenuto di Polifenoli totali in estratto metanolico di <i>B.bituminosa</i> | 110 |
| Tabella 20 RADICI FINE PERIODO contenuto di Polifenoli totali in estratti metanolici di <i>B.bituminosa</i> | 111 |
| Tabella 21 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO Potere antiossidante foglie di <i>B.bituminosa</i> estratte con metanolo | 111 |
| Tabella 22 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO Potere antiossidante foglie di <i>B.bituminosa</i> estratte con metanolo | 112 |
| Tabella 23 RADICI FINE PERIODO Potere antiossidante radici di <i>B.bituminosa</i> estratte con metanolo | 112 |
| Tabella 24 PERIODO VEGETATIVO:Percentuale dei mg eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di foglie di <i>B.bituminosa</i> | 113 |
| Tabella 25 PERIODO RIPRODUTTIVO Percentuale dei mg eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di foglie di <i>B.bituminosa</i> | 113 |
| Tabella 26 FIORI: percentuale dei mg di eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> periodo riproduttivo | 114 |
| Tabella 27 RADICI: percentuale dei mg di eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 114 |
| Tabella 28 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO:percentuale dei mg di bitucarpina A contenutain estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 114 |
| Tabella 29 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO: percentuale dei mg di bitucarpina A contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 115 |
| Tabella 30 FIORI: Percentuale dei mg di bitucarpina A contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> periodo riproduttivo | 115 |
| Tabella 31 RADICI: percentuale dei mg di bitucarpina A contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> fine periodo. | 116 |
| Tabella 32 FOGLIE PERIODO VEGETAIVO: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 117 |
| Tabella 33FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 117 |
| Tabella 34 FIORI: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 118 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabella 35 RADICI: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 118 |
| Tabella 36 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO:Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 119 |
| Tabella 37 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO:Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 120 |
| Tabella 38 FIORI:Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 120 |
| Tabella 39 RADICI:Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 120 |
| Tabella 40 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO:Percentuale dei mg di angelicina contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 122 |
| Tabella 41FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO Percentuale dei mg di angelicinae contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 122 |
| Tabella 42 FIORI:Percentuale dei mg di angelicinae contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 123 |
| Tabella 43 RADICI:Percentuale dei mg di angelicinae contenuta in estratti cloroformici di <i>B.bituminosa</i> | 123 |
| Tabella 44 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO, FOGLIE FIORI RADICI PERIODO RIPRODUTTICO | 124 |
| Tabella 46 SPME composti volatili foglie periodo riproduttivo <i>B.bituminosa</i> | 127 |

1. *Bituminaria bituminosa* L.

1.1. Inquadramento sistemico

REGNO: *Plantae*

PHYLUM: *Magnoliophyta*

CLASSE: *Rosidae*

ORDINE: *Fabales*

FAMIGLIA: *Fabaceae*

GENERE: *Bituminaria*

SPECIE: *bituminosa*

EPITETO: *Linneo*

1.2. Introduzione

La *Bituminaria bituminosa* L. (sinonimo di *Psoralea bituminosa* L., Fabaceae) è una pianta erbacea o arbustiva perenne volgarmente conosciuta come “trifoglio cavallino”, “trifoglio bituminoso”, “trifoglio odoroso” o “fassolara”. Il nome *Psoralea* deriva dal termine greco “psoraleos”, che significa “affetto da scabbia o da lebbra”, con riferimento alle punteggiature ghiandolari nerastre che si trovano sulle parti erbacee e sul calice (Innocenti et al., 1997). È chiamata bituminosa a causa del forte odore di bitume derivante dalle numerose ghiandole resinose sparse su tutta la pianta che la rendono particolarmente riconoscibile (Tava et al., 2007).

Il genere *Psoralea* comprende dalla 100 alle 115 specie tra cui *P.corylifolia*, *P.glandulosa*, *P.morisiana*, *P.macrostachy*, *P.onobrychi* e *P.plicata* diffuse nei territori caldi di tutto il mondo ed è conosciuto in letteratura come fonte di furanocumarine e flavonoidi. Sin dall'antichità è stato documentato l'utilizzo delle diverse specie (Innocenti et al., 1997) nella medicina popolare, per le loro proprietà disinfettanti, cicatrizzanti (*Bituminaria bituminosa*), ripigmentanti e febbrifughe (*Psoralea corylifolia* e *Psoralea glandulosa*.)



Figura 1 Pianta di *Bituminaria bituminosa*

1.3. Descrizione botanica di *Bituminaria bituminosa* L.

La *B. bituminosa* si presenta sottoforma di siepi e di cespugli sul margine stradale, oppure in boscaglie su suoli non troppo aridi (Pistelli et al., 2003). Il fusto e le foglie sono ricoperti da macchioline nere e pellucide con forte odore resinoso. Tutta la pianta è ricoperta da peli unicellulari, eretti e setosi: bianchi sulle foglie e sulla parte inferiore del fusto, bianchi e neri sull'infiorescenza.

Il fusto è scuro e striato con portamento ramoso ed eretto. Può raggiungere un'altezza di circa 60-100 cm. Le foglie trifogliate (Figura 3), due laterali opposte e una terminale più grande distanziata dalle altre, con stipole lanceolate e cuspidate sono portate da un lungo picciolo (2-80 mm) angoloso e solcato. Il rachide è di 3-17 mm.



Figura 2 Pianta di *Bituminaria bituminosa*



Figura 3 Foglie e fiori di *Bituminaria bituminosa*

I fiori (Figura 4) hanno un colore che vira dal blu al viola; sono riuniti in infiorescenze (10-30) emisferiche a capolini con un diametro di circa 2-3 cm. Sono avvolti alla base da due brattee a denti acuminati e portati da un lungo peduncolo. Il calice è campanulato, ispido con i due denti inferiori più lunghi e setole argentine. La corolla ha un vessillo stretto e allungato con ali più lunghe della carena. La pianta fiorisce tra maggio e luglio. I frutti (Figura 5) indeiscenti, che sporgono dal calice, hanno una forma a camera allungata di circa 2 cm, sono ricoperti da numerose ghiandole nerastre e da peli bianchi e neri. Dal frutto si ricavano i semi (Figura 6) dalla forma uncinata e anch'essi ricoperti da peli.



Figura 4 Fiore di *Bituminaria bituminosa*



Figura 5 Frutto di *Bituminaria bituminosa*



Figura 6 Seme di *Bituminaria bituminosa*

1.4. Distribuzione geografica

La *B. bituminosa* è una pianta che cresce nelle sponde aride, nelle garrighe, nei boschi poco ombreggiati fino a 1000-1200 m di altitudine (Figura 7). È diffusa nel bacino del Mediterraneo e cresce spontaneamente anche in Crimea, in Arabia e nelle isole Canarie. In Italia è distribuita in tutte le regioni centromeridionali (figura 7), specialmente nella zona del Nizzardo, in Liguria, nel sud della penisola e nelle isole, mentre è rara o assente in alcune regioni settentrionali.

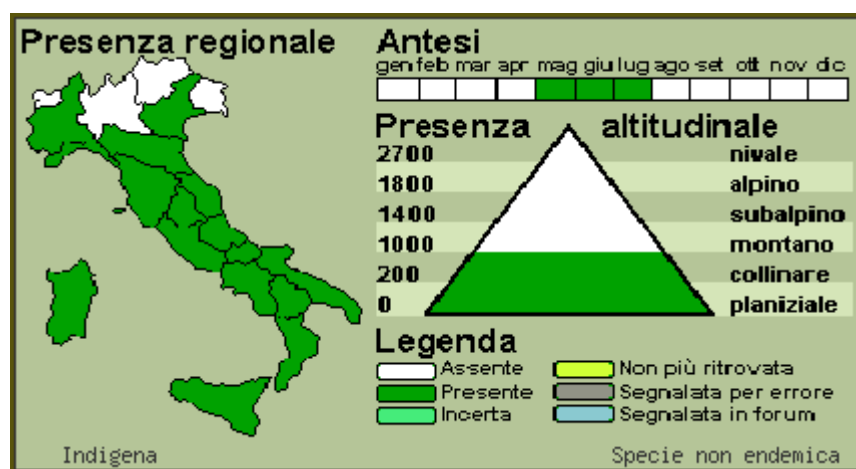


Figura 7 Distribuzione geografica di *Bituminaria bituminosa*

2. Fitochimica del genere *Psoralea*

2.1. Principali metaboliti secondari

Le ricerche fitochimiche fino ad ora condotte si sono soffermate principalmente su diverse specie di *Psoralea*: *Psoralea corylifolia* (Zhao L. et al., 2005), *P.glandulosa*, *P.macrostachya*, *P.onobrychis* e *P.plicata* oltre che su *B.bituminosa* di cui verrà trattato nel capitolo successivo. I composti isolati ed identificati appartengono a classi chimiche diverse (Hamed et al., 1997; Innocenti et al., 1990; Pistelli et al., 2003):

- Furanocumarine
- Flavonoidi e derivati
- Pterocarpani
- Terpeni
- Derivati dell'acido idrossicinnamico

2.1.1. Furanocumarine

Le furanocumarine, o furocumarine, sono sostanze organiche naturali appartenenti alla classe delle cumarine prodotte da diverse varietà di piante. La struttura chimica delle furanocumarine deriva dalla condensazione di un nucleo cumarinico con un anello del furano. Tra gli isomeri più diffusi troviamo le furanocumarine lineari, dove l'anello furanico è attaccato al C6 e C7 del nucleo cumarinico, e le furanocumarine angolari, dove invece l'anello furanico è attaccato al C7 e C8. Le furanocumarine sono tossiche e fotomutagene per questo sono considerate agenti protettivi contro l'aggressione di insetti e vertebrati (Cappelletti et al., 1992). Inoltre agiscono come inibitori della germinazione dei semi e come regolatori della crescita delle piante.

I derivati cumarinici più rappresentati nel genere *Psoralea* sono lo psoralene, una furanocumarina lineare e l'angelicina una furanocumarina angolare, rinvenute entrambe in tutte le specie studiate (Figura 8).

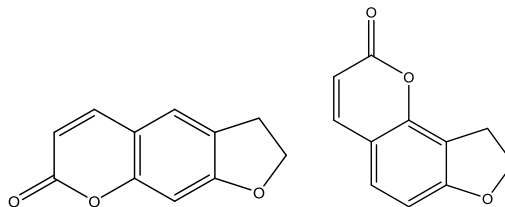


Figura 8 Struttura molecolare psoralene ed angelicina

Per identificare le furanocumarine sono stati utilizzati tre metodi di estrazione (Innocenti et al., 1991; 1997):

- estrazione metanolica seguita da idrolisi acida
- estrazione metanolica preceduta da idrolisi acida
- idrolisi enzimatica (β -glucosidasi)

I tipi di estrazione riportati suggeriscono che i due metaboliti possono trovarsi nella pianta anche sottoforma di glicosidi. Oggi queste tecniche estrattive non vengono più utilizzate in quanto si preferisce estrarre i glicosidi con diversi tipi di solventi e poi caratterizzarli tal quali con NMR.

Le due furanocumarine sono contenute prevalentemente nelle foglie e nei semi di tutte le specie di *Psoralea*, ma la loro quantità può variare notevolmente da una specie all'altra.

Il confronto fra quattro specie di *Psoralea* (*P. bituminosa*, *P. glandulosa*, *P. macrostachya* e *P. onobrychis*) riguardo al contenuto in psoralene ed angelicina in diverse parti della pianta ha messo in evidenza differenze significative, infatti il contenuto totale di furanocumarine non solo varia notevolmente nelle quattro specie esaminate (*P. bituminosa* e *P. onobrychis* ne contengono meno della metà rispetto a *P. glandulosa* e *P. macrostachya*), ma il sito di accumulo di tali composti sembra essere diverso (foglie per *P. glandulosa*, radici e rami per *P. macrostachya*, distribuzione omogenea in *P. bituminosa* e *P. onobrychis*). Inoltre sono state osservate differenze nel rapporto fra le quantità di psoralene ed angelicina: la *P. glandulosa* è caratterizzata da alti livelli di psoralene, mentre in *P. macrostachya* prevale l'angelicina. Il diverso contenuto di psoralene e angelicina sembra essere correlato con la capacità che hanno alcuni sistemi enzimatici di compiere una isoprenilazione in due posizioni differenti dello scheletro cumarinico: l'isoprenilazione

in posizione 6 porta alle furanocumarine lineari, come lo psoralene, mentre l'isoprenilazione in posizione 8 porta agli isomeri angolari, come l'angelicina. Quindi le differenze osservate nel rapporto psoralene/angelicina in specie diverse ma cresciute nello stesso ambiente, fa ipotizzare che tale rapporto sia caratteristico di ogni singola specie (Innocenti et al., 1991).

Lo psoralene e l'angelicina sono stati ottenuti ed identificati da macerati di foglie di *P.plicata* in seguito ad estrazione con esano (Hamed et al., 1997), mentre nel 2004 l'angelicina è stata isolata da estratti metanolici dei semi di *P.corylifolia* (Khatune et al., 2004).

L'angelicina è stata isolata sia dai semi che dai frutti di *P.corylifolia* (Wang et al., 2004; Hsu et al., 2001).

2.1.2. Flavonoidi e derivati

I flavonoidi costituiscono una delle classi di composti più caratteristiche nelle piante superiori. Molti di questi sono facilmente riconoscibili come pigmenti fiorali nella maggior parte delle angiosperme. La loro distribuzione non è limitata ai fiori ma include tutte le parti della pianta, in particolare frutti e foglie. Rappresentano un gruppo di sostanze pressoché ubiquitarie che agiscono in natura soprattutto come cromofori, antiossidanti, antimicrobici ed immunostimolanti. Da un punto di vista chimico rappresentano un ampio e complesso gruppo di composti polifenolici contenenti un anello eterociclico.

I principali derivati nelle specie *Psoralea* sono stati i calconi. Dai semi di *P.corylifolia* è stato identificato il bacucalcone (Figura 9), un diidrofuranocalcone (Gupta. et al., 1982).

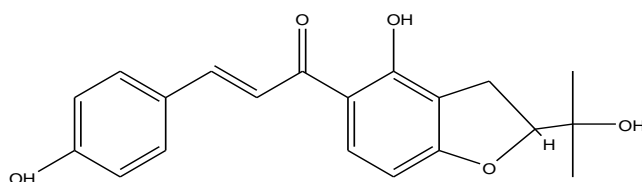


Figura 9 Struttura molecolare del bacucalcone

Da estratti metanolici di semi di *P.corylifolia* è stato identificato l'isobavacalcone (Figura 10) (Tsai et al., 1996) ed il bavachromanolo e la psoralidina (Suri et al., 1980) (Figura 11). Nel 2002 Haraguchi et al., hanno identificato da estratti metanolici di semi di *P.corylifolia* tre flavonoidi, bavachinina, bavachina e isobavachina (figura 12). Nel 2005 Jiangning et al., hanno isolato da estratti cloroformici di *P.corylifolia* (pianta intera) la corylifolina (Figura 13).

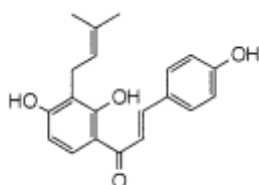


Figura 10 Struttura molecolare isobavacalcone

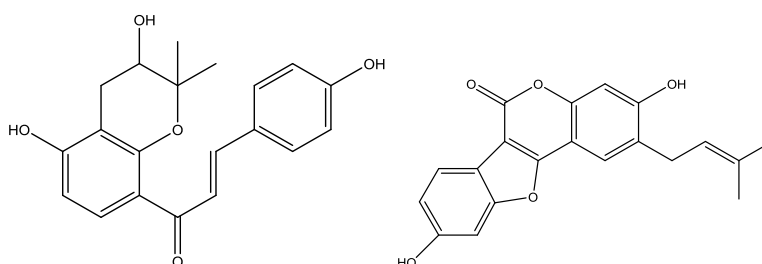


Figura 11 Struttura molecolare bavachromanolo e psoralidina

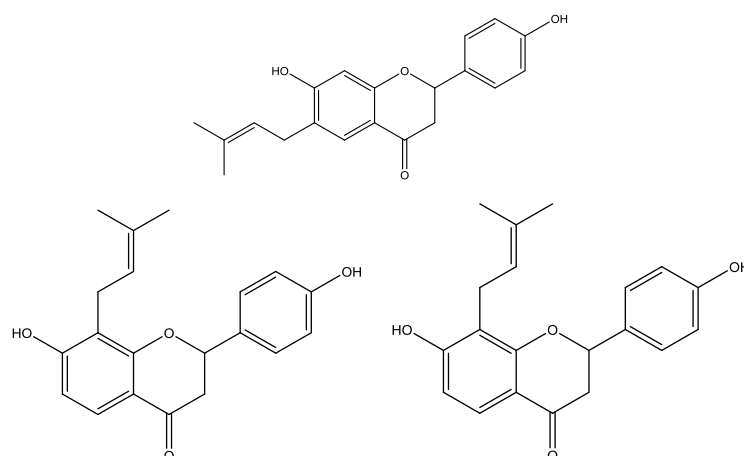


Figura 12 Struttura chimica bavachinina, bavachina, isobavachina

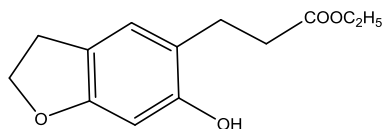


Figura 13 Struttura molecolare corilifolina

2.1.3. Isoflavonoidi

Gli isoflavonoidi formano una sottoclasse ben separata dai flavonoidi, essendo una variante strutturale in cui l'anello aromatico derivato dallo shikimato si è spostato sul carbonile adiacente.

Gli isoflavonoidi hanno attività estrogenica sufficiente ad influenzare la riproduzione degli animali da pascolo e per questo sono detti fitoestrogeni. Queste molecole planari indubbiamente imitano la forma e la polarità dell'ormone steroideo estradiolo. Per questo è necessario limitare il consumo di foraggio da parte degli animali da pascolo, o in alternativa scegliere varietà con basso contenuto di isoflavonoidi. Si ritiene che gli isoflavonoidi nella dieta umana, per esempio quelli derivati dalla soia, diano protezione verso i tumori dipendenti dagli estrogeni come il cancro al seno in quanto diminuiscono la disponibilità dell'ormone naturale.

Questi metaboliti si accumulano principalmente nelle foglie, nei frutti e nelle radici delle piante.

Gli isoflavonoidi isolati da varie specie di *Psoralea* sono prevalentemente due (Sun. et al., 1998; Hamend et al., 1997; Suri., 1978; Gupta et al., 1978): daidzeina e genisteina (Figura 14).

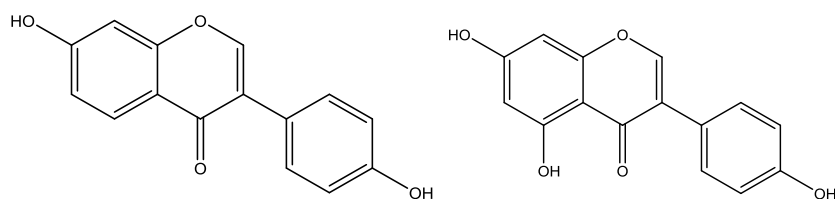


Figura 14 Struttura molecolare daidzeina e genisteina

Nel 1978 è stato identificato, da estratti etanolic di semi di *P.corylifolia*, lo psoralenolo (Dahr et al., 1978) (Figura 15).

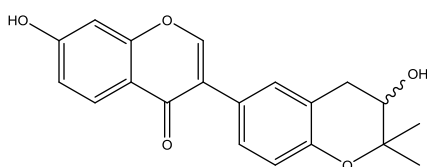


Figura 15 Struttura molecolare psoralenolo

Dal macerato di foglie di *P. morisina* è stata isolata la 8-prenildaizaina (Figura 16) (Pistelli et al., 2003) precedentemente ottenuta solo in tracce da altri estratti.

Amit et al (2010) hanno dimostrato che la daidzeina è maggiormente accumulata nelle radici rispetto alle parti aeree della pianta, mentre la genisteina nei frutti immaturi. La presenza di daidzeina è stata osservata anche nelle colture in vitro, ed in particolare nelle colture di callo, ottenute da espianti radicali (Amit et al., 2010).

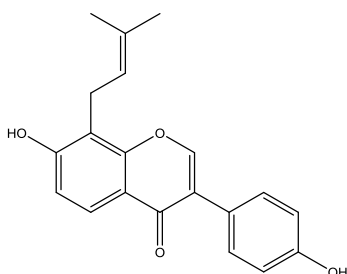


Figura 16 Struttura molecolare 8-prenildaizaina

Oltre alla daidzeina ed alla genisteina è stato identificato il neobavaisoflavone (Figura 17) da estratti metanolici dei semi di *P.corylifolia* (Tsai et al., 1996).

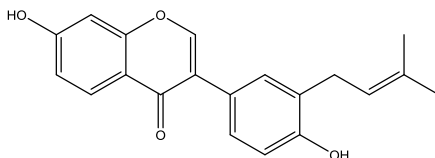


Figura 17 Struttura molecolare neobavaisoflavone

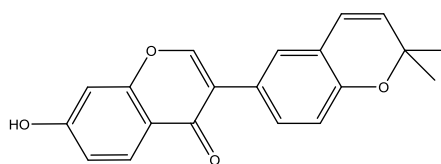


Figura 18 Struttura molecolare corilina

2.1.4. Pterocarpani

Gli pterocarpani sono derivati degli isoflavonoidi. Fanno parte dei meccanismi naturali che la pianta usa per difendersi dagli attacchi dei patogeni infatti vengono prodotti in seguito a lesioni o attacco patogenico e per questo definite fitoalessine; si trovano principalmente nelle foglie. Dal macerato con acetone di foglie e dai fiori di *P.morisiana* sono stati estratti ed identificati due pterocarpani: erybraedina C e bitucarpina A (Figura 19) (Pistelli et al., 2003).

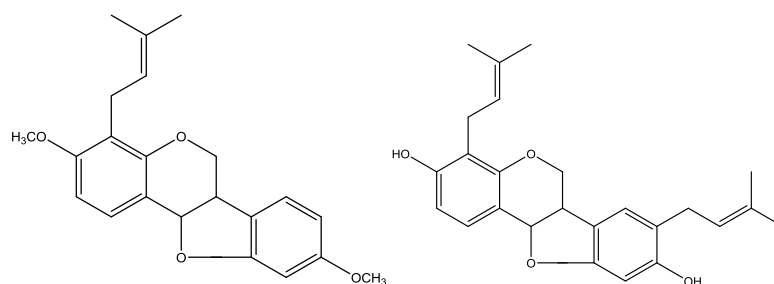


Figura 19 Struttura chimica di bitucarpina A ed eribraedina C

Nel 2010 è stata isolata la morisianina (Figura 19), un nuovo pterocarpano, da semi di *B.morisiana* dopo estrazione in acetato di etile e purificazione ottenuta mediante VLC (vacuum liquid chromatography) e HPLC semipreparativo (Leonti et al., 2010).

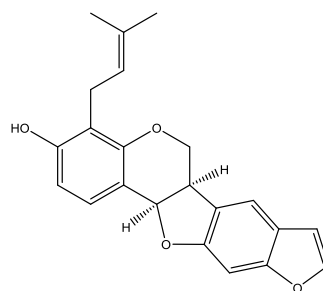


Figura 20 Struttura molecolare morisianina

2.1.5. Terpeni

I terpeni sono biomolecole costituite da multipli dell'unità isoprenica (sono chiamati anche isoprenoidi), e possono essere lineari, ciclici o entrambi. Vengono prodotti da molte piante e sono i componenti principali delle resine e degli oli essenziali. Rappresentano anche i precursori biosintetici degli steroidi. In base al numero di unità isopreniche contenute (C_5H_8), si ha la seguente classificazione: emiterpeni (1), monoterpeni (2), sesquiterpeni (3), diterpeni (4), sesterpeni (5), triterpeni (6) e politerpeni (maggiore di 6).

Dall'estratto cloroformico di foglie e semi di *P. glandulosa* e di *P. corylifolia* è stato isolato il bacuchiolo (Figura 21), un meroterpene. Tale composto, come alcuni suoi derivati, possiede una moderata attività "antifeedant", che sembra essere influenzata

positivamente dalla presenza di un atomo di ossigeno sostituito sul C-12 o sul C-13 (Labbé et al., 1996; Sun et al., 1998; Backhouse et al., 2001; Jiangningg et al., 2005; Peng et al., 1996).

Questo metabolita oltre a possedere un'attività antibiotica, mostra anche le proprietà di un ormone giovanile degli insetti (JH). Il composto è presente in tutte le parti della pianta ed in tutte le fasi dello sviluppo.

Il bacuchiolo è stato, inoltre, identificato in frutti di *P. corylifolia* estratti con esano (Rangari et al., 1992).

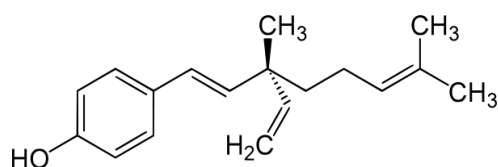


Figura 21 Struttura molecolare bacuchiolo

2.1.6. Derivati dell'acido idrossicinnamico

Tra i derivati dell'acido idrossicinnamico è stata identificata la plicatina B dall'estratto in acetone delle parti aeree di *P.morisiana* (Figura 22) (Pistelli et al., 2003). In precedenza questo metabolita era stato isolato dall'estratto delle foglie di *P.plicata* con esano (Hamed et al., 1997).

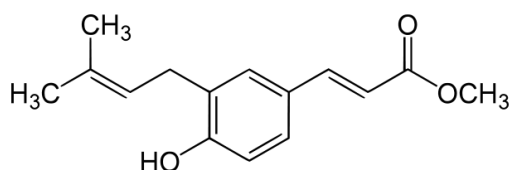


Figura 22 Struttura chimica delle plicatina B

La Plicatina A (Figura 23), invece, è stata isolata in seguito ad estrazione con acetone a partire dalle foglie di *P.plicata* (Hamend et al., 1997).

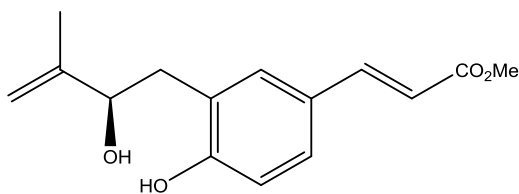


Figura 23 Struttura chimica Plicatina A

2.2. Composti volatili nel genere psoralea

I composti volatili sono stati ricercati negli oli essenziali ottenuti sia dalle parti aeree di *P. pubescence* (El-Seedi et al., 2010) e *P. drupacea* (Bondarenkoo et al., 1972) che dai semi di *P. corylifolia* (Dua et al., 2013).

I principali costituenti identificati dalle parti aeree sono stati: β -myrcene (4.2%) (Figura 24) (monoterpene idrogenato), β -caryophyllene (8.5%), α -humulene (4.6%), germacrene D (6.8%) (Figura 25) (sesquiterpeni idrogenati) e cariofillene oxide (1,9%) (Figura 27) (sesquiterpene ossigenato).

I principali costituenti identificati dai semi sono risultati essere l' E-caryophyllene (17,84%) (Figura 28) (monoterpene idrogenati), caryophyllene oxide (40,79%) (Figura 27) (monoterpene ossigenato), α -humulene (2,15%) (Figura 25), (+)-aromadendrene (2,15%) (Figura 28) (sesquiterpeni idrogenati).

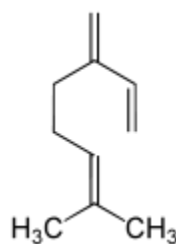


Figura 24 Struttura molecolare β -myrcene

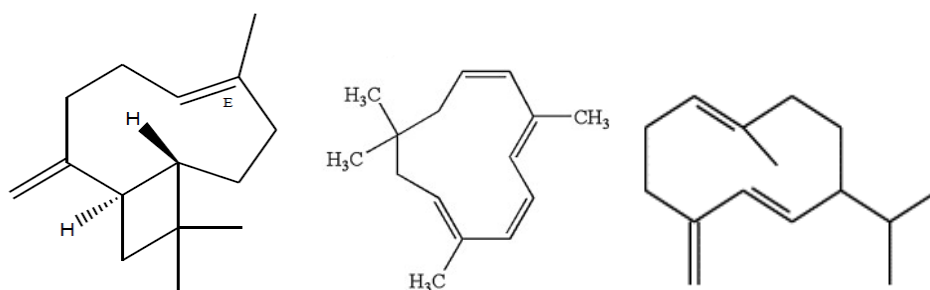


Figura 25 Struttura molecolare β -cariofillene, α -umulene e germacrene D

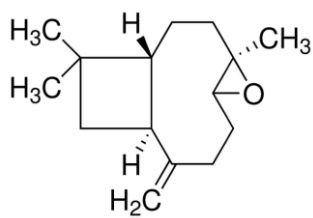


Figura 26 Struttura molecolare cariofillene ossido

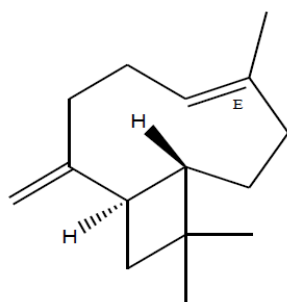


Figura 27 Struttura molecolare E-cariofillene

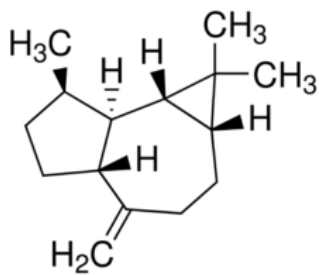


Figura 28 Struttura molecolare (+)-aromadendrene

2.3. Studi fitochimici su *Bituminaria bituminosa* L.

Gli studi fitochimici effettuati su *B.bituminosa* si sono soffermati principalmente sull'identificazione e quantificazione delle furanocumarine già determinate in altre specie di *Psoralea*: lo psoralene e l'angelicina (Figura 8) (Innocenti et al., 1997). Tra le due, l'angelicina è risultato il composto più abbondante ed il suo sito preferenziale di accumulo è il frutto.

L'estrazione delle due furanocumarine è avvenuta utilizzando le metodologie già illustrate. Le rese maggiori sono state ottenute tramite idrolisi enzimatica (Innocenti et al., 1997).

Nella pianta angelicina e psoralene possono essere ritrovati sia nella loro forma glicosilata, che nella loro forma libera. Quella glicosilata viene immagazzinata come prodotto di accumulo e riserva nei vacuoli. La conversione nella forma libera è resa possibile dalla rottura del vacuolo e successiva idrolisi da parte dell'enzima β -glicosidasi (Haskins e Gorz, 1961).

I livelli di furanocumarine non sono sempre gli stessi ma possono variare a seconda dello stato della pianta. È stato dimostrato che nello stadio vegetativo le foglie di bituminosa hanno una maggiore concentrazione di metaboliti rispetto allo stadio riproduttivo dove, oltre che alla diminuzione di furanocumarine nelle foglie, si osserva un aumento degli stessi metaboliti nei frutti. Questo sottolinea che con l'inizio delle stagioni calde le furanocumarine vengono trasportate dalle foglie ai frutti (Walker et al., 2012). L'aumento dei metaboliti in quest'ultimi è fondamentale in quanto dà protezione sia verso gli animali erbivori che verso le infezioni.

I livelli di furanocumarine possono variare se la pianta è sottoposta a stress. Ad esempio quelle che crescono in luoghi molto caldi mostrano una maggiore concentrazione di metaboliti nelle foglie allo stato vegetativo rispetto a quelle delle piante fatte crescere a temperature più basse (Walker et al., 2012). Anche l'irrigazione può modificare i livelli di furanocumarine: piante meno irrigate producono più metaboliti rispetto a quelle irrigate ogni giorno (Walker et al., 2012).

Le ricerche fitochimiche hanno dimostrato che la seconda classe di metaboliti più abbondanti nella bituminosa è quella degli pterocarpani. Erybraedina C e bitucarpina A (Figura 19) sono stati determinati e quantificati esclusivamente a partire da estratti di parti

aeree della pianta con acetone (Pistelli et al., 2003). Per la prima volta è stata isolata la bitucarpina B (Figura 29) (Pistelli et al., 2003). Sono stati inoltre identificati nelle parti aeree di *B.bituminosa* la Plicatina B (Figura 22) ed i due isoflavonoidi, genisteina e daidzeina (Figura 15) e l'8-prenildaideina (Figura 17), tramite eluizione con miscela di etere di petrolio e acetato di etile in rapporto 6:4, proveniente dal frazionamento cromatografico dell'estratto di parti aeree di bituminosa con acetone (Pistelli et al., 2003).

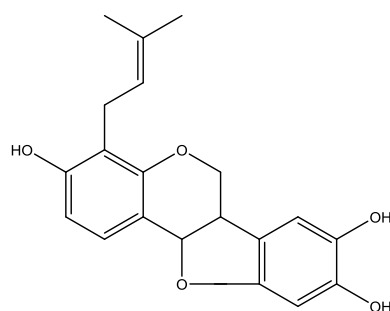
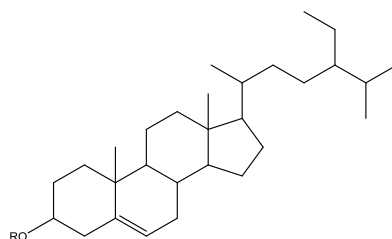


Figura 29 Struttura chimica di bitucarpina B

Infine nelle radici sono stati identificati due steroli : il β -sitosterolo e il suo glucoside (β -sitosterolo 3-O-glucoside) (Pistelli et al., 2003) (Figura 30).



R= H β -sitosterolo

R=glc β -sitosterolo 3-O-glucoside

Figura 30 Struttura chimica β -sitosterolo e β -sitosterolo 3-O-glucoside

I pochi studi fitochimici riguardo i componenti volatili trovati in *B.bituminosa* hanno evidenziato la presenza di diverse classi quali:

- Terpeni
- Alcoli alifatici
- Aldeidi alifatiche

I composti volatili sono stati ricercati (Pistelli et al., 2004; Tavaet al., 2007) :

- negli olii essenziali
- nel residuo acquoso della pianta ottenuto in seguito ad idrodistillazione degli olii essenziali
- nella pianta fresca tramite solid phase micro-extraction (SPME)

I principali composti identificati negli olii essenziali ottenuti dalle foglie sono stati i sesquiterpeni quali: (E)-cariofillene (23%) (Figura 27), β -farnesene (18%) (Figura 31), germacrene D (24%) α -humulene (5%) (Figura 25), δ -cadinene (4%) (Figura 32), γ -muurulene (Figura 33) e α -copaene (Figura 34). L'analisi SPME mostra invece un maggior accumulo di monoterpeni quali triciclene (8%) (Figura 35), α -pinene (8%) (Figura 36), camfene (10%) (Figura 37), β -pinene (6%) (Figura 38), β -ocimene (3%) (Figura 39). Oltre ai sesquiterpeni sono stati identificati anche due alcoli quali (Z,Z)-9,12-octadecadien-1-ol (Figura 40) (6,1-28,0%) e (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrien-1-ol (Figura 41) (9,8-24,7%).

Tramite l'analisi dello spazio di testa (SPME) sono stati identificati anche sesquiterpeni come il D-germacrene (Figura 26) , l'E- cariofillene (Figura 27) e l' α -copaene (Figura 34). La loro concentrazione però è maggiore negli olii essenziali. Negli estratti acquosi non sono stati ritrovati né monoterpeni né sesquiterpeni, ma due alcoli alifatici: 3-(Z)-hexen-1-ol (Figura 42) (37%) e l' 1-octen-3-ol (Figura 43) (27%) entrambi nella loro forma glicosilata.

Gli olii essenziali ottenuti dai fiori sono costituiti principalmente da sesquiterpeni, in particolare da D-germacrene (Figura 25) (18%), E-cariofillene (Figura 27) (18%), β -farnesene (Figura 31) (6%) ed α -humulene (Figura 25). Oltre ai sesquiterpeni anche nei fiori sono stati ritrovati i due alcoli (Z,Z)-9,12-octadecadien-1-ol (Figura 40) (21,0%) e (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecadien-1-ol (Figura 41) (18,7%). I monoterpeni, negli olii essenziali, sono presenti in basse concentrazione (9%) rispetto ai sesquiterpeni (80%), ma si osserva un incremento del 54% nelle frazioni volatili ottenute tramite SPME. I principali composti ritrovati sono stati: triciclene (Figura 35) (10%), α -pinene (Figura 36) (8%), E-cariofillene(Figura 27) (8%) e germacrene D (Figura 25) (6%).

Negli estratti acquosi non sono stati ritrovati i due alcol alifatici identificati nelle foglie,ma altri componenti come: linalolo (3%) (Figura 44), 4-terpineolo (1%) (Figura 45), α -

terpineol (1%) (Figura 45), geraniolo (4%) (Figura 47), E-anetolo (7%) (Figura 48) e timolo (1%) (Figura 49).

Gli olii essenziali ottenuti dai semi di *B.bituminosa* sono costituiti sia da sesquiterpeni quali *E*-cariofillene (Figura 27), D-germacrene (Figura 25) che da monoterpeni quali triciclene (Figura 35), α -pinene (Figura 36) e camfene (Figura 37). L'analisi SPME conferma la presenza del triciclene (17%) (Figura 345 e dell' α -pinene (45%) (Figura 36). I livelli dei due monoterpeni sono comunque più bassi di quelli dei sesquiterpeni ritrovati negli olii essenziali. Tramite l'analisi SPME sono stati identificati due aldeidi alifatiche: *n*-eptanale (Figura 50) e *n*-nonale (Figura 51), mentre negli olii essenziali ne sono state individuate solo tracce.

Negli estratti acquosi sono stati individuati due alcoli: 1-octen-3-ol (1%) (Figura 43) e spatunelol (2%) (Figura 52).

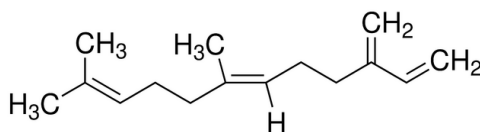


Figura 31 Struttura molecolare β -farnesene

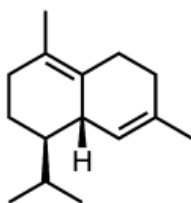


Figura 32 Struttura molecolare δ -cadinene

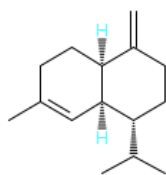


Figura 33 Struttura molecolare γ -muurenone

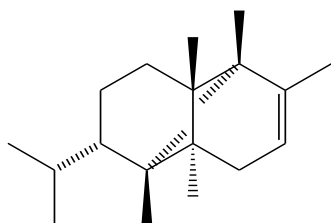


Figura 34 Struttura molecolare α -copaene

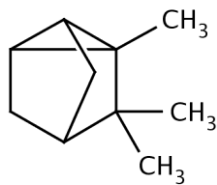


Figura 35 Struttura molecolare tricyclene

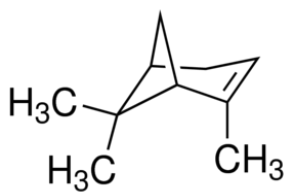


Figura 36 Struttura molecolare α -pinene

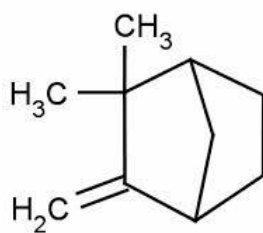


Figura 37 Struttura molecolare camfene

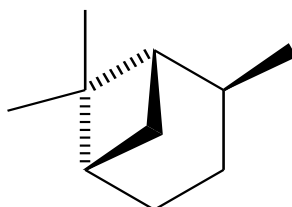


Figura 38 Struttura molecolare β -pinene

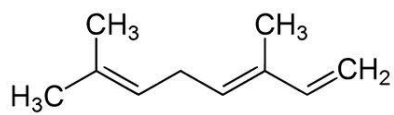


Figura 39 Struttura molecolare β -ocimene

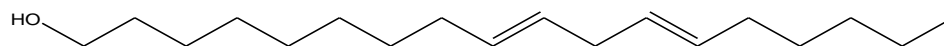


Figura 40 Struttura molecolare (Z,Z)-9,12-octadecadien-1-ol

[Digitare il testo]

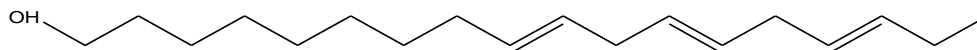


Figura 41 Struttura molecolare (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrien-1-ol

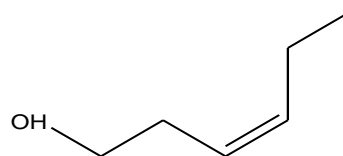


Figura 42 Struttura chimica del 3-hexen-1-ol

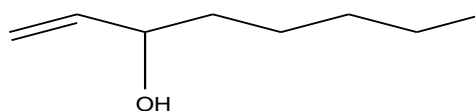


Figura 43 Struttura molecolare 1-octen-3-ol

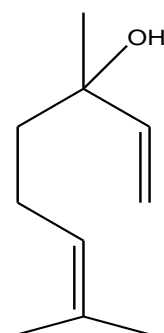


Figura 44 Struttura molecolare linalolo

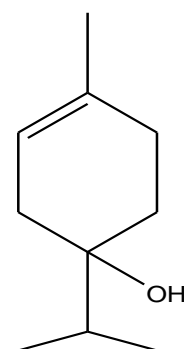


Figura 45 Struttura molecolare 4-terpineolo

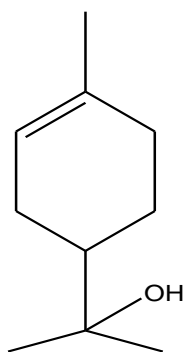


Figura 46 Struttura molecolare α -terpineolo

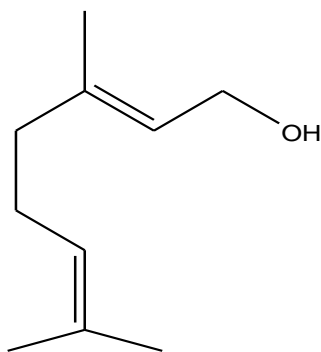


Figura 47 Struttura molecolare geraniolo

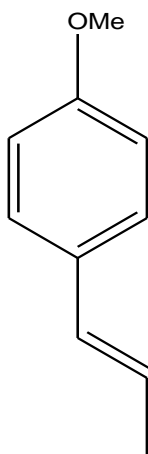


Figura 48 Struttura molecolare E-antetolo

[Digitare il testo]

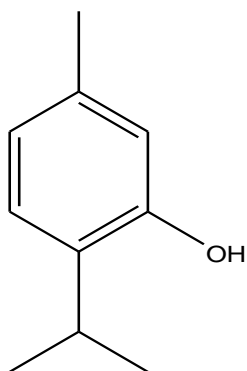


Figura 49 Struttura molecolare timolo

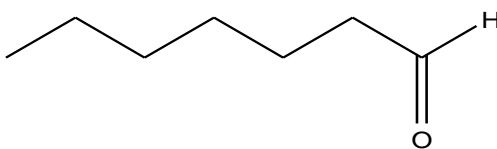


Figura 50 struttura molecolare n-eptanale

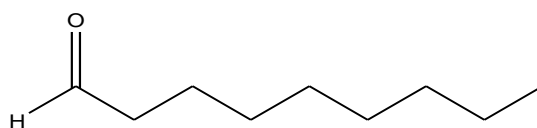


Figura 51 struttura molecolare n-nonale

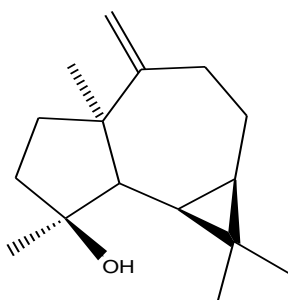


Figura 52Struttura molecolare spatunelolo

3. VIE BIOSINTETICHE DEI PRINCIPALI METABOLITI PRESENTI IN *Bituminaria bituminosa*

I principali metaboliti ritrovati nella *B. bituminosa* appartengono a due classi principali:

- derivati fenolici
- terpeni

3.1. I derivati fenolici

I derivati fenolici sono caratterizzati dall'avere almeno un anello benzenico con uno o più sostituenti ossidrilici (OH) di tipo fenolico i quali possono essere liberi, metilati (metossili), legati a zuccheri (glicosidi) o ad acidi (esteri).

Dal punto di vista biogenetico quasi tutti derivano dall'acido shikimico e prevedono come intermedi la fenilalanina e l'acido para cumarico. La via dello shikimato favorisce una via alternativa verso i composti aromatici L-fenilalanina e L-tirosina i quali costituiscono la base delle unità fenilpropanoidiche C_6C_3 ritrovate in molti prodotti naturali come acido cinnamico, cumarine, flavonoidi ed isoflavonoidi. Un intermedio della via biosintetica è l'acido shikimico isolato per la prima volta da piante del genere *Illicium* (in giapponese “shikimi”).

3.1.1. Biosintesi dell'acido shikimico

L'acido shikimico si forma a partire da Fosfoenolpiruvato (PEP) e D-eritrosio-4-fosfato che tramite una condensazione aldolica, formano l' Acido-3-deossi-D-arabino-eptulosonico-7-fosfato (DAHP) il quale eliminando una molecola di acido fosforico l'acido-3-deidrochinico.

L'acido andando incontro ad una reazione di disidratazione, seguita da una riduzione porta alla formazione dell'acido shikimico (Figura 53).

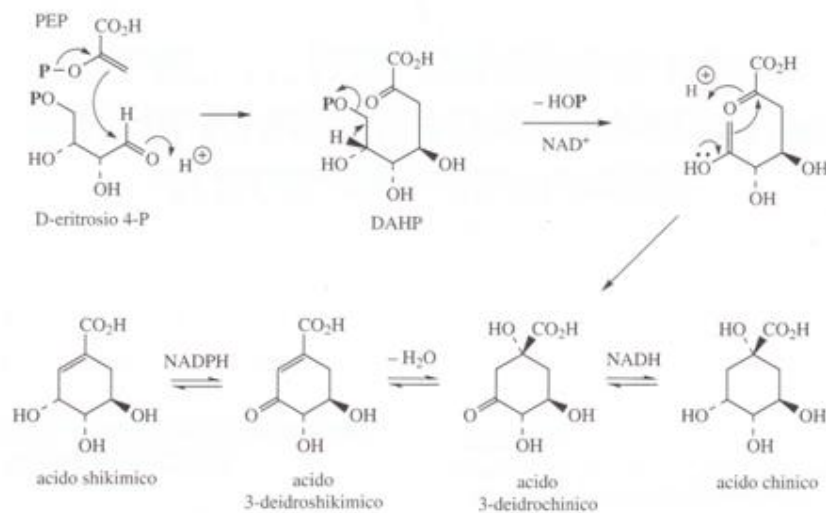


Figura 53 formazione dell'acido shikimico

3.1.2. Sintesi dell'acido corismico e degli aminoacidi aromatici

L'acido shikimico subendo una reazione di fosforilazione, dipendente dall'ATP, su uno dei tre gruppi ossidrilici forma l'acido shikimico-3-fosfato a cui si addiziona una molecola di PEP tramite una reazione di addizione-eliminazione che porta alla formazione dell'acido-5-enolpiruvilshikimico 3 fosfato (EPSP).

L'EPSP subisce, infine, una reazione di eliminazione 1,4 dell'acido fosforico formando l'acido corismico (Figura 54).

[Digitare il testo]

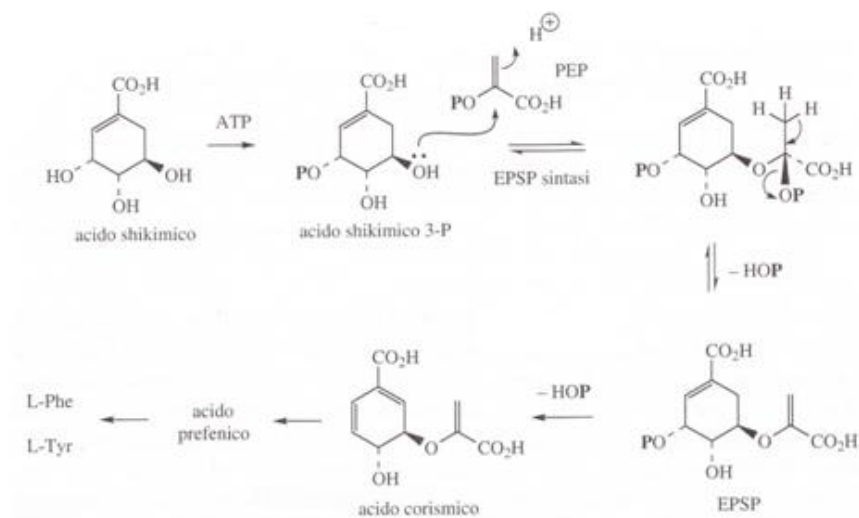


Figura 54 Sintesi acido corismico

Dall'acido corismico tramite una trasposizione di Claisen si otterrà l'acido prefenico. (Figura 55).

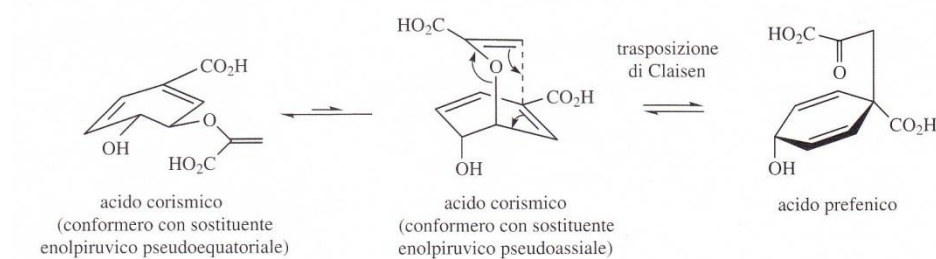


Figura 55 Sintesi dell'acido prefenico

A partire dall'acido prefenico si possono ottenere, tramite due vie diverse, L-fenilalanina e L-tirosina. Ogni via prevede tre reazioni

1. Aromatizzazione decarbossilativa
2. Transaminazione dipendente dal piridossal fosfato PLP (vitamina B6)
3. Ossidazione (solo nel caso della formazione della tirosina)

Ciò che differenzia le strade percorribili è solo l'ordine con cui avvengono le reazioni (Figura 56).

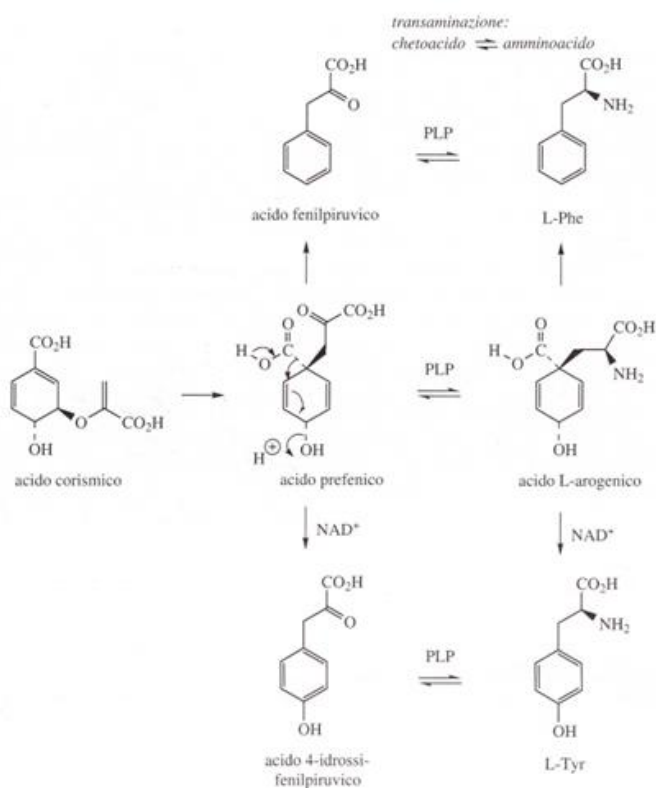


Figura 56 Formazione di L-fenilalanina e L-tirosina

3.1.3. Sintesi degli acidi cinnamici

La L-fenilalanina e la L-tirosina vengono considerati come mattoni biosintetici C_6C_3 e sono i precursori di una vasta gamma di sostanze naturali. Nelle piante il primo stadio che si osserva è l'eliminazione di ammoniaca dalla catena laterale per formare il rispettivo acido *trans* (E) cinnamico. Nel caso della fenilalanina questo dà l'acido cinnamico, mentre la tirosina dà l'acido 4-cumarico (Figura 57).

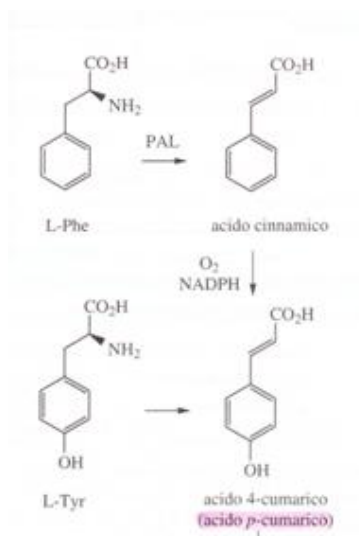


Figura 57 Sintesi acido p-cumarico

3.1.4. Biosintesi delle cumarine e dei loro derivati

Il primo passo per ottenere le cumarine ed i loro derivati è l'ossidrilazione dell'acido cinnamico o dell'acido 4-cumarico in orto alla catena laterale (Figura 58) ottenendo rispettivamente l'acido 2-cumarico e l'acido 2,4-diidrossicinnamico, quindi i due acidi 2-idrossicinnamici subiscono un cambiamento della configurazione del doppio legame da trans a cis (Figura 59).

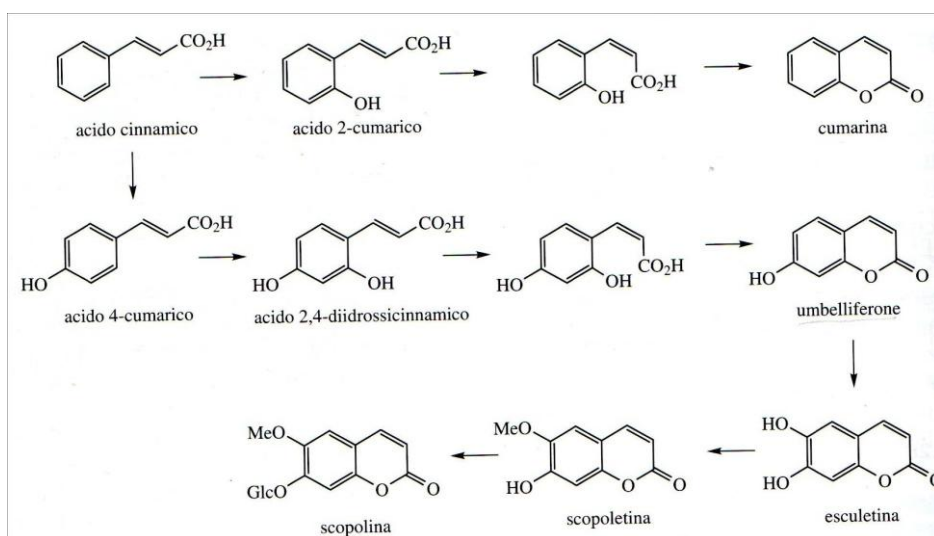


Figura 58 Sintesi delle cumarine

Questa isomerizzazione sarebbe sfavorevole nel caso di un singolo doppio legame isolato, ma negli acidi cinnamici il sistema completamente coniugato fa sì che questo processo avvenga abbastanza facilmente. Infine i due acidi subiscono una reazione di lattonizzazione per formare la cumarina e l'umbelliferone rispettivamente (Figura 58). In natura sia l'isomerizzazione *cis/trans*, che la lattonizzazione sono mediate da enzimi.

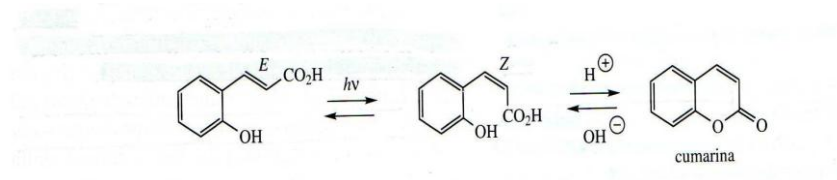


Figura 59 Isomerizzazione trans-cis dell'acido 2-4-diidrossicinnamico

Molte altre cumarine naturali hanno uno scheletro più complesso ed incorporano carboni addizionali derivati dall'acido mevalonico (Figura 60). L'anello aromatico dell'umbelliferone è attivato in orto dal gruppo ossidrilico e può essere quindi alchilato dal dimetilallil difosfato. Il gruppo dimetilallilico introdotto nella demetilsuerosina può in seguito ciclizzare con il gruppo fenolico per dare la marmesina. Successivamente una seconda mono-ossigenazione rimuove il frammento idrossilico (come acetone) dalla marmesina per dare la furanocumarina psoralene (Figura 61). L'angelicina, essendo una furanocumarina angolare si forma attraverso una sequenza di reazioni simili ma che prevedono la dimetilallilazione nell'altra posizione *orto* del fenolo.

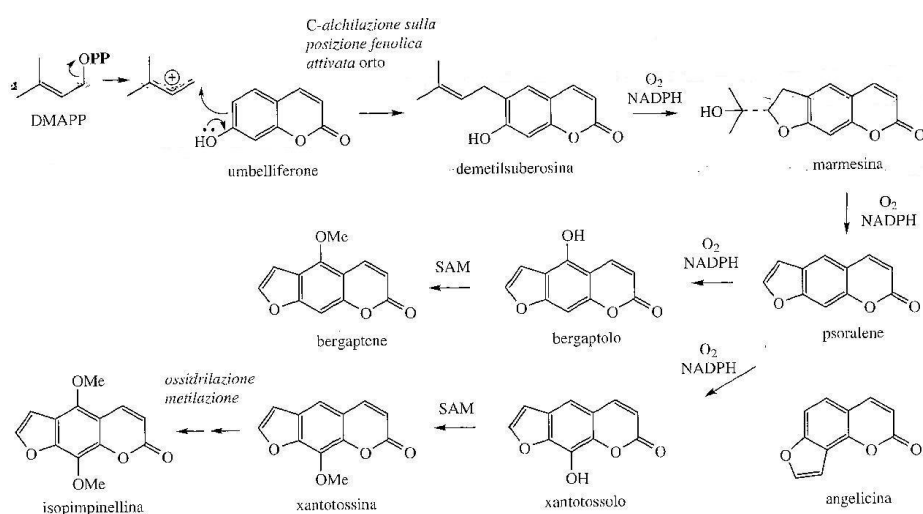


Figura 60 Sintesi psoralene ed angelicina

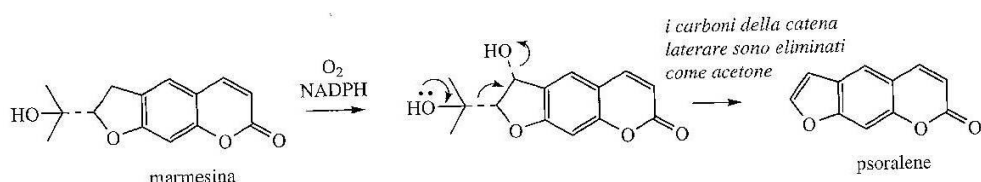


Figura 61 Sintesi dello psoralene a partire dalla marmesina

3.1.5. Biosintesi degli isoflavonoidi e degli pterocarpani

Gli acidi cinnamici ed i loro esteri insieme al coenzima A possono fungere da unità iniziali per l'allungamento di catena con unità di malonil CoA, promuovendo la formazione dei flavonoidi e dei suoi derivati come gli isoflavonoidi e gli pterocarpani. Nella maggior parte dei casi sono aggiunte tre unità C₂ di malonato per dare polichetidi (Figura 62). Possono così avvenire condensazioni aldolica o di Claisen che generano anelli aromatici. Gli enzimi stilbene sintasi e calcone sintasi accoppiano una unità di cinnamoil CoA con tre unità di malonil CoA per dare rispettivamente stilbeni, come il resveratrolo, o calconi, come il narigenin-calcone. Durante la sintesi dei calconi l'intervento di una reduttasi porta prima della reazione di claisen porta alla formazione di un altro calcone, ovvero della isoliquiritigenina. I calconi rappresentano i precursori principali di un ampia gamma di

flavonoidi ritrovati in tutto il regno vegetale. Una volta formati subiscono un attacco nucleofilo tipo Micheal del gruppo fenolico sul chetone insaturo che porta alla formazione di un anello eterociclo. Dal naringenin-calcone si forma la naringenina, mentre dalla isoliquiritigenina si forma la liquiritigenina. Entrambe sono due flavanoni (Figura 62).

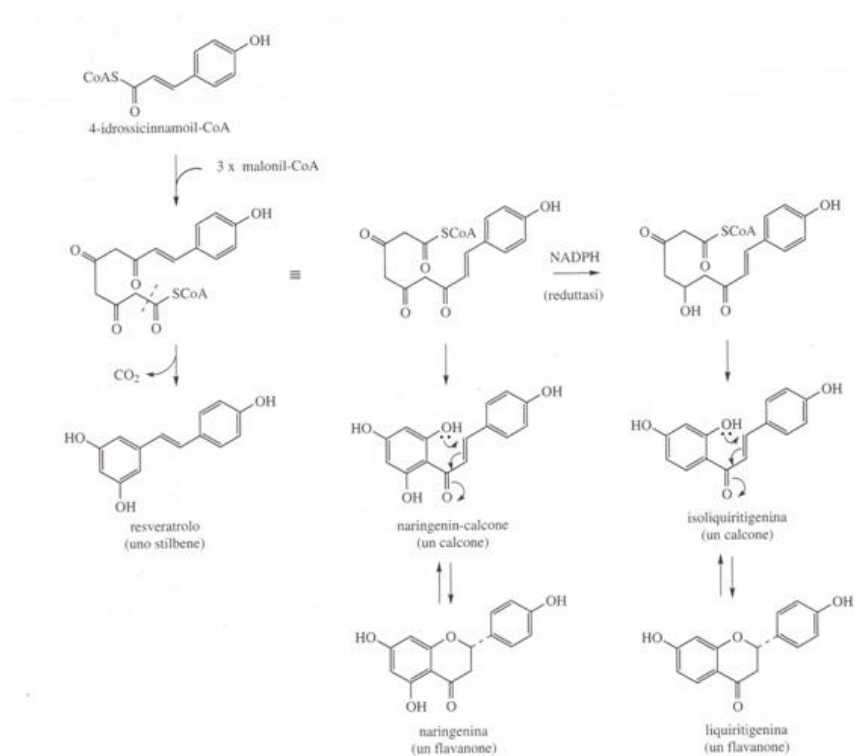


Figura 62 Sintesi dei calconi e dei flavanoni

I flavanoni sono i precursori degli isoflavoni, sottoclasse ben separata dei flavonoidi, essendo una variante strutturale in cui l'anello aromatico derivato dallo shikimato si è spostato sul carbonile adiacente (Figura 63). Questa reazione è effettuata da un enzima dipendente dal citocromo P-450 che richiede O₂ e NADPH come cofattori e trasforma i flavanoni liquiritigenina e naringenina rispettivamente negli isoflavoni daidzeina e genisteina attraverso idrossiisoflavanoni intermedi (Figura 64). Questa trasposizione è piuttosto rara in natura, e gli isoflavonoidi sono limitati quasi esclusivamente alla famiglia delle Leguminose. Nonostante ciò sono stati identificati molte centinaia di differenti isoflavonoidi, e la complessità strutturale è ottenuta attraverso reazioni di ossidrilazione ed alchilazione, variando lo stato di ossidazione dell'anello eterociclico, o formando anelli eterociclici aggiuntivi come nel caso degli pterocarpani. La daidzeina subisce una

metilazione sul gruppo ossidrilico portando alla formazione della formononetina, la quale forma un ulteriore anello eterociclico ottenendo un pterocarpano : la medicarpina. Da qui avranno origine tutti gli altri pterocarpani tra cui l'erybraedina C e la bitucaroina A.

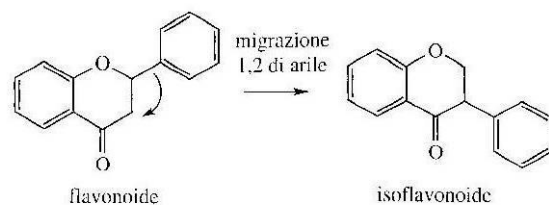


Figura 63 Sintesi degli isoflavoni a partire dai flavonoidi

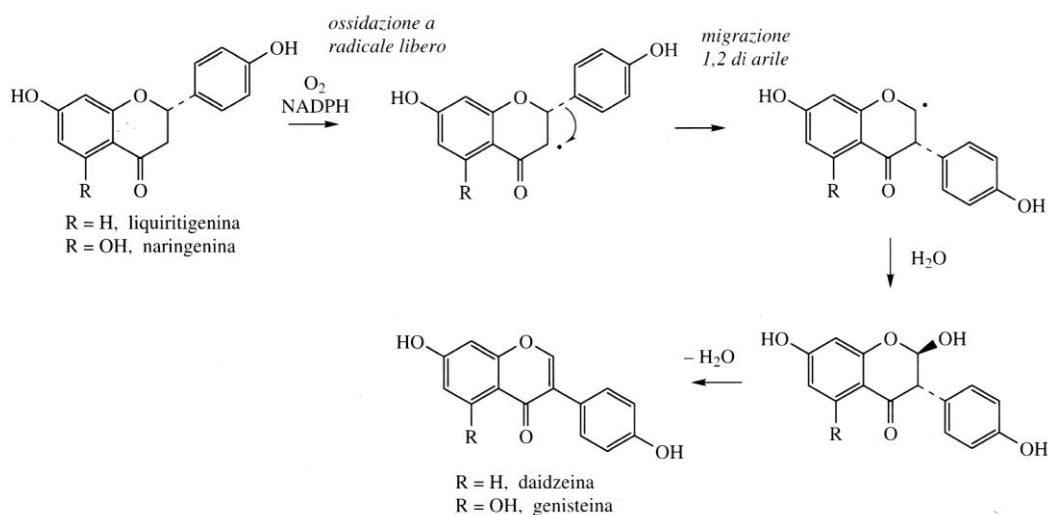


Figura 64 Sintesi daidzeina e genisteina

3.2. I terpeni

I terpenoidi costituiscono una vasta famiglia di sostanze naturali strutturalmente diverse tra loro, derivanti da unità isopreniche C₅ (Figura 65).

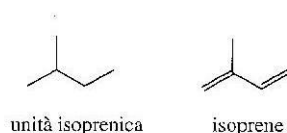


Figura 65 Unità isoprenica

I monoterpeni sono costituiti da 2 unità isopreni che, mentre i sesquiterpeni da tre unità.

Le unità biochimiche isopreniche derivano dal metabolismo dell'acetato, attraverso la formazione di acido mevalonico (MVA).

Nella biosintesi dell'acido mevalonico vengono utilizzate tre molecole di acetil-coenzima A, due si combinano inizialmente in una reazione di Claisen per dare acetoacetyl CoA e una terza molecola viene incorporata attraverso una reazione aldolica stereospecifica che porta alla formazione del β-idrossi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). L'HMG-CoA viene poi trasformato in (3R)-MVA, il quale a sua volta viene trasformato in isoprenil PP (IPP). L'IPP viene isomerizzato in dimetilallil PP (DMAPP) (Figura 66).

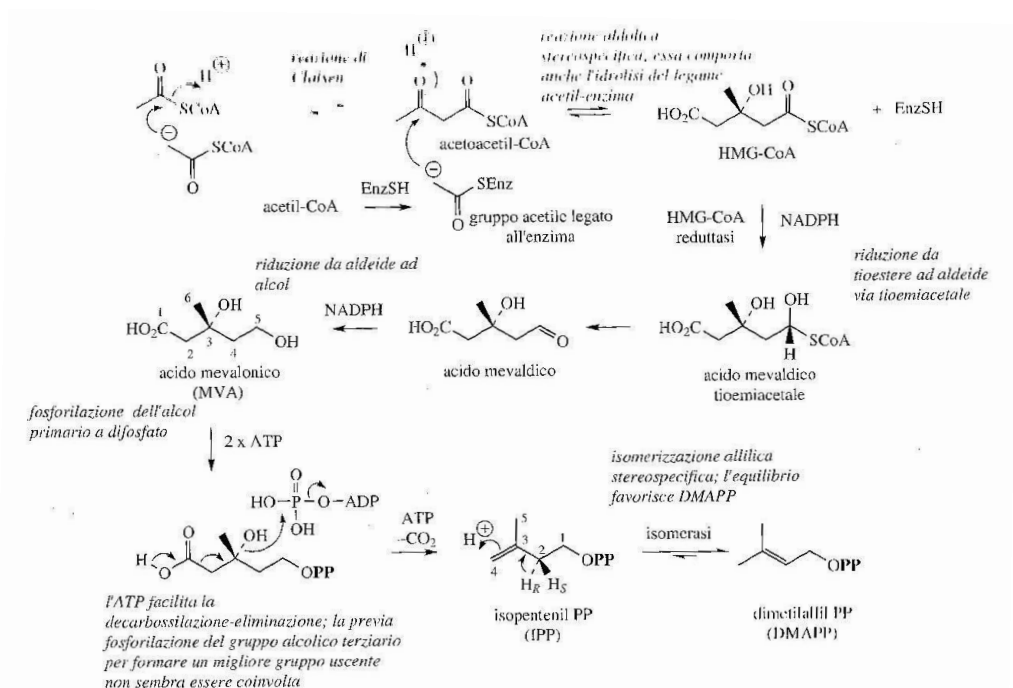


Figura 66 Sintesi del DMAPP dimetilallil pirofosfato

3.2.1. Sintesi dei monoterpeni presenti in *B.bituminosa*

La giunzione tra DMPP e IPP porta alla formazione del geranil difosfato (GPP) (Figura 67).

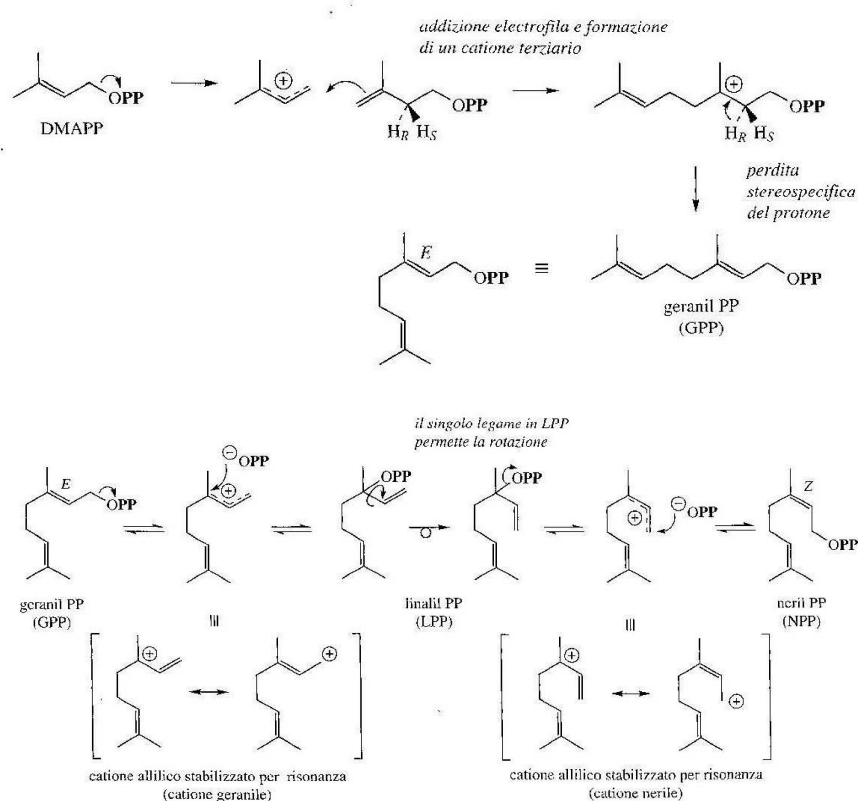


Figura 67 Sintesi GPP, LPP e NPP

Il linalil PP ed il neril PP sono isomeri del GPP ed è possibile che si formino a partire dal geranil PP per ionizzazione a catione allilico, su cui è possibile un attacco del gruppo difosfato in una posizione diversa o una variazione stereochimica del doppio legame (Figura 67).

Neril PP e linalil PP hanno una stereochimica favorevole alla ciclizzazione e l'uno o l'altro o entrambi sembrerebbero i precursori più diretti dei sistemi ciclici, la cui biosintesi è schematizzata in figura-- , attraverso la formazione di un carbocatione (metilene o α -terpinile) (Figura 68).

Il GPP, l'LPP ed il NPP in seguito a modificazioni relativamente semplici, possono dare origine ad una serie di monoterpeni lineari che si ritrovano come componenti degli oli volatili e che vengono usati nella produzione di aromi e profumi (Figura 69).

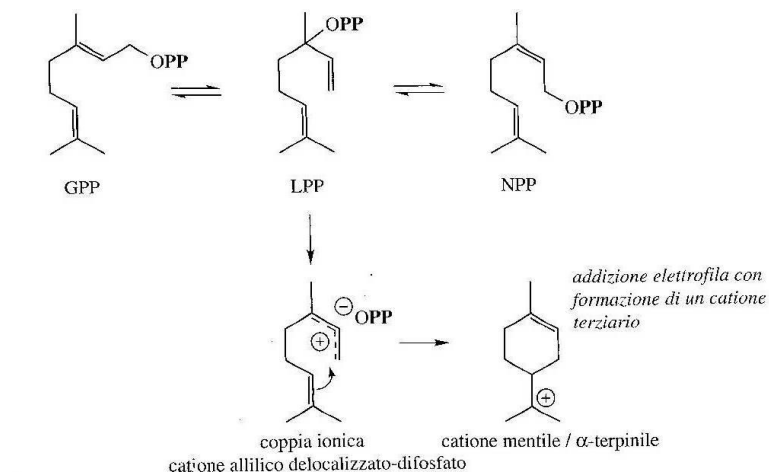


Figura 68 Sintesi monoterpeni ciclici

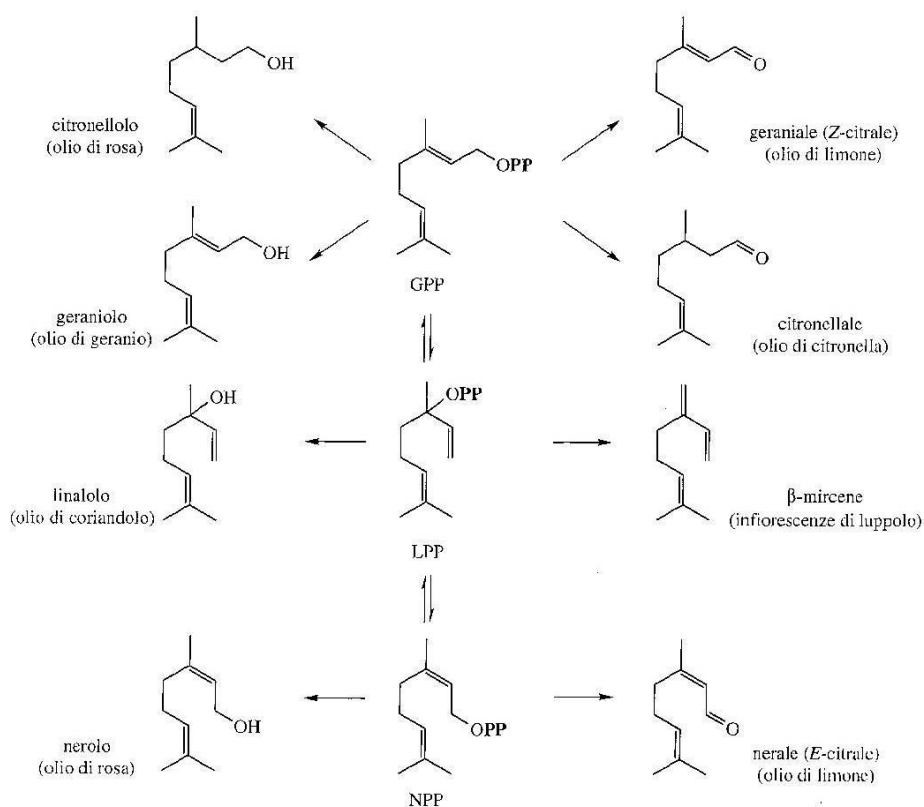


Figura 69 Sintesi dei principali monoterpeni

Le reazioni di ciclizzazione dei monoterpeni portano alla formazione di sistemi monociclici e biciclici. In Figura 70 sono mostrati alcuni esempi di questi sistemi ciclici.

Il ripiegamento della catena laterale cationica verso il doppio legame porta alla formazione di cationi biciclici bornile o pinile a seconda di quale estremità del doppio legame viene coinvolto nella formazione dei nuovi legami (Figura 70).

L' α -pinene ed il β -pinene derivano dal catione pinile in seguito alla perdita di due diversi protoni che portano alla formazione di un doppio legame ciclico o esociclico, rispettivamente (Figura 70).

Dal carbocatione secondario bornile, mediante una trasposizione di Meerwein-Wagner, si forma il carbocatione terziario isofenchile il quale, perdendo un protone, porta alla formazione del canfene (Figura 70).

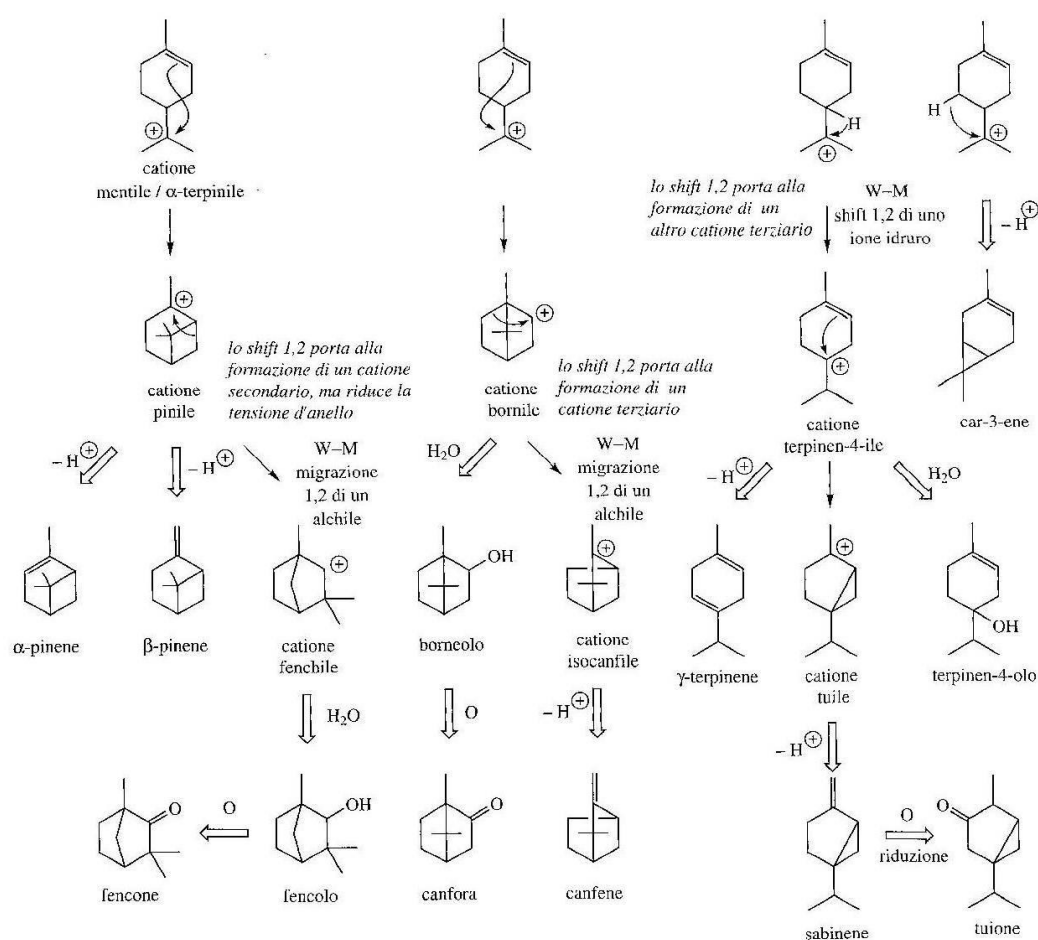


Figura 70 Sintesi dei principali monoterpeni presenti in *B. bituminosa*

3.2.2. Sintesi dei sesquiterpeni presenti in B.bituminosa

L'aggiunta di un'ulteriore unità C₅ IPP al geranil difosfato porta alla formazione del precursore fondamentale dei sesquiterpeni: il farnesil difosfato (FPP) (Figura 71) il quale può dare origine ad una serie di sesquiterpeni lineari o ciclici. Il numero dei possibili modi di ciclizzazione aumenta in virtù dell'aumentare della lunghezza della catena e della presenza dei doppi legami addizionali, il che può portare a strutture mono-, bi-, tri-cicliche. Il doppio legame più vicino al gruppo difosfato può adottare una configurazione *E* o una configurazione *Z* (Figura 72).

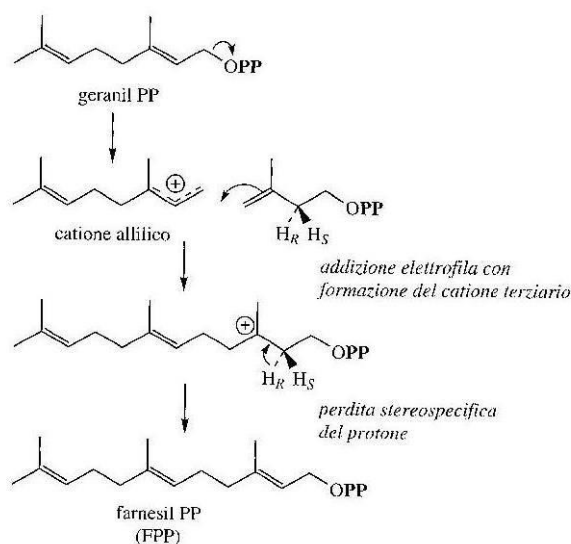


Figura 71 Sintesi farnesil pirofosfato (FPP)

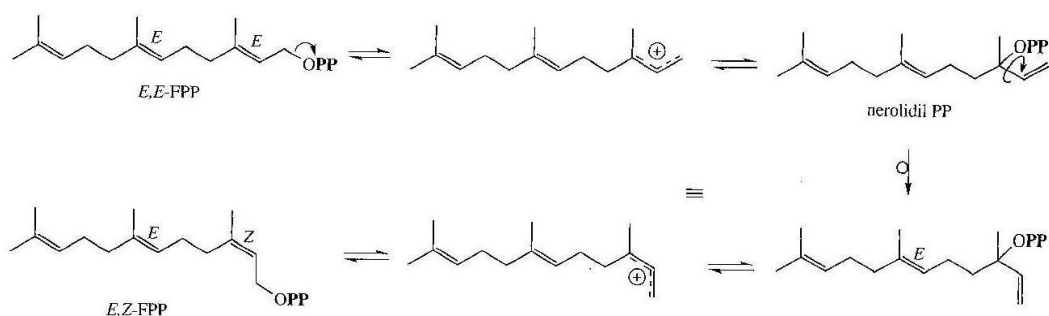


Figura 72 Configurazioni possibili del FPP

La geometria del doppio legame consente differenti possibilità sia per il ripiegamento della catena carboniosa, sia per la ciclizzazione ottenuta per l'attacco elettrofilo sul doppio legame appropriato. Si formano così una serie di sistemi ciclizzati da cui hanno origine i vari sesquiterpeni (Figura 73).

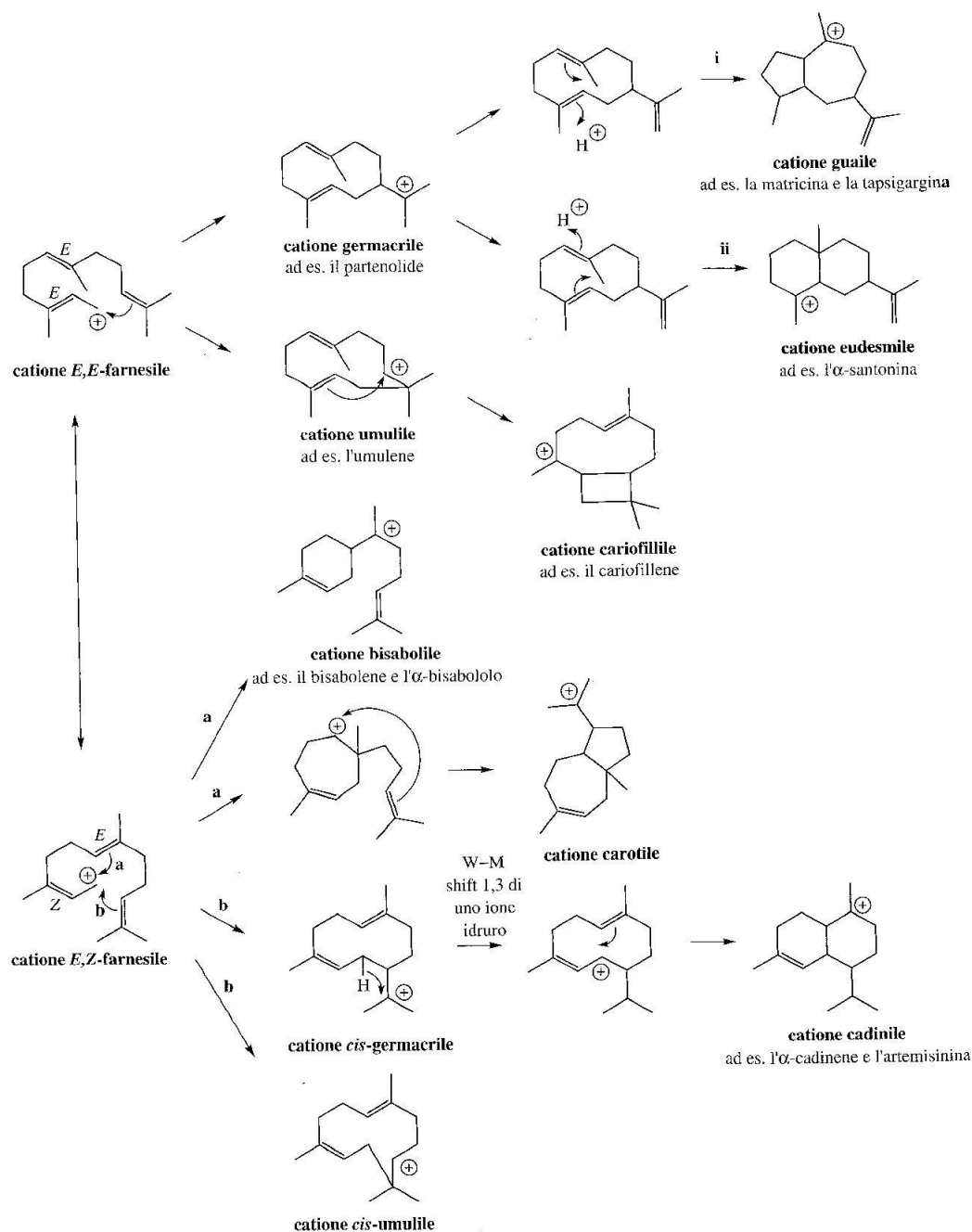


Figura 73 Formazione dei principali cationi da cui originano i sesquiterpeni

Il catione germacrile è un precursore dei sesquiterpeni della classe del germacrano come per esempio il germacrolo (Figura 74).

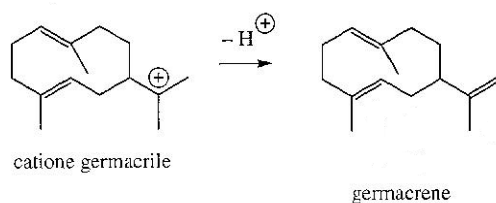


Figura 74 Sintesi del germacrene

Dal catione umulile, invece, si forma tramite la perdita di un protone l'umulene (Figura 75).

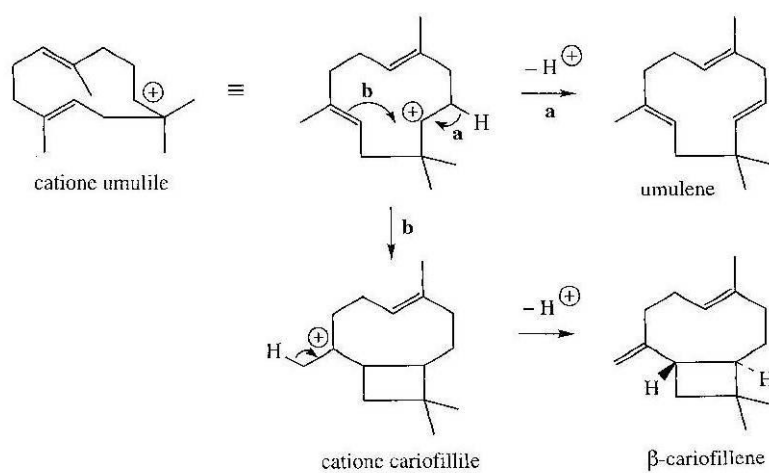


Figura 75 Sintesi dell'umulene

4. UTILIZZO DI *Bituminaria bituminosa* IN MEDICINA

4.1. Utilizzo in medicina popolare del genere *Psoralea*

L'utilizzo, come rimedi naturali, delle piante appartenenti al genere *Psoralea* è noto sin dall'antichità. Già nel 1400 a.C. nel libro sacro indiano Atharva-veda, era descritto l'utilizzo dei semi di *P.corylifolia* per la ripigmentazione della pelle vitiligginosa. Nel XVIII secolo in Francia ed Inghilterra la *P.bituminosa* veniva coltivata come pianta ornamentale le cui foglie erano utilizzate per la preparazione di decotti anti-cancrenosì, mentre dai semi veniva estratto un olio utilizzato contro le paralisi. Nella medicina tradizionale indiana contemporanea i semi di *P.corylifolia* vengono utilizzati come afrodisiaci e nel trattamento delle emorragie uterine mentre l'olio ottenuto dagli stessi semi viene raccomandato per uso topico nella vitiligine, nella psoriasi, nell'alopecia (Sun et al., 1998; Tsai et al., 1996). Nella medicina ayurvedica i semi sono utilizzati come antielmintici, diuretici e stomachici (Latha et al., 1999). In Cile l'utilizzo delle piante come rimedio per malattie è molto diffuso tanto che anche il genere *Psoralea* trova uso. Gli infusi di *P.glandulosa* vengono utilizzati sia nelle indigestioni accompagnate da diarrea che come febbrifughi e vermifughi (Backhouse et al., 2001). L'infuso viene applicato sulle ferite (Backhouse et al., 2001). Nell'isola di Madeira il decotto di foglie di *P.bituminosa* con alcol ed iodio viene utilizzato per rinforzare i capelli (Riviera et al., 1995). Nella medicina popolare ligure le foglie di *B.bituminosa* vengono utilizzate per la loro azione disinfettante ed emostatica (Fenaroli et al., 1998; Maccioni et al., 1998).

4.2. Attività farmacologica del genere *Psoralea*

Le ricerche farmacologiche condotte fino ad ora sul genere *Psoralea* si sono soffermate principalmente su due specie: *P. corylifolia* e *P. glandulosa*. Negli ultimi anni gli studi si sono ampliati comprendendo anche la specie bituminosa.

ATTIVITÀ PIGMENTANTE

La *Psoralea* viene utilizzata principalmente a livello cutaneo, infatti estratti di semi di *Psoralea corylifolia* vengono impiegati per combattere la vitiligine. Le furanocumarine presenti nelle piante, in particolar modo lo psoralene, sono responsabili sia dell'attività ripigmentante a livello dermico sia dell'attività foto sensibilizzante (Zobel et al., 1991). Una dose orale seguita da una irradiazione UV ad elevata lunghezza d'onda è la base del trattamento, anche se necessita di grande attenzione per minimizzare il rischio di ustioni, formazioni di cataratte e cancro alla pelle. Questo trattamento è denominato spesso PUVA (psoralene + UV-A) ed è utile anche nei casi di psoriasi. La reazione con psoralene inibisce la duplicazione del DNA nell'uomo e riduce la velocità di divisione cellulare. Questi effetti possono creare difficoltà nella manipolazione di piante che contengono alti livelli di furanocumarine. Il contatto con le piante può causare reazioni di ipersensibilità alla luce UV creando una forma di scottatura solare, chiamata fotofitodermite, o più spesso una rapida formazione di vesciche per contatto diretto con la linfa. La sensibilità alle furanocumarine varia da individuo ad individuo: alcuni non ne risentono affatto, altri si sensibilizzano dopo un primo contatto sviluppando poi una reazione allergica nelle successive esposizioni (Nguyen et al., 1992; Dewick et al., 2001; Bourgaud et al., 2006).

ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA

La capacità di legarsi covalentemente alle basi pirimidiniche del DNA e del RNA conferisce alle furanocumarine proprietà antiproliferative contro cellule viventi in quanto prevengono la replicazione del DNA. Il legame che si va a formare è luce-dipendente. Le furanocumarine, hanno mostrato attività antimutagenica, antiinfiammatoria ed immunomodulatrice (Latha et al., 1999).

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA ED ANTIFUNGINA

Estratti etanolic di semi e di foglie di *P.corylifolia* e *P.glandulosa* possiedono una forte attività antibatterica ed antifungina riconducibile alla presenza sia delle furanocumarine sia bacuchiolo (Deve t al., 1973; Khatune et al., 2004). Gli estratti sono stati testati utilizzando il metodo Disc diffusion. Confrontando i diametri di inibizione delle tetracicline con quelli degli estratti è stato osservato che la *Psoralea* ha dato risultati positivi sia sui GRAM + quali *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus β-haemolyticus*, sia su GRAM- quali *Escherichia coli*, *Shigella dysenterae*, *Shigella shiga*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella sarcinaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morganii*, *Enterobacter erogene* ed *Alcaligenes fecalis* (Naznin et al., 2004; S.Chanda et al., 2011; Bang-Le Zhang et al., 2010).

I funghi sui quali sono stati testati gli estratti e sui quali questi hanno avuto un riscontro positivo sono stati: *Candida albicans*, *Candida parasilopsis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae*, *Caldida glabata*, *Candida albicans sp*, *Candida guilliermondii*, *Candida dublinensis* (Madrid et al., 2012). I risultati riportati in letteratura evidenziano una normale attività antifungina degli estratti in vitro con un valore di inibizione della crescita IC50 intorno ad 80 µg/ml.

Gli olii essenziali ottenuti tramite idrodistillazione delle foglie di *P.pubescence* hanno mostrato attività antibatterica verso *Staphylococcus aureus* (GRAM+), *Escherichia coli*, *Klesbsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa* (GRAM-) (El-Seedi et al., 2010).

ATTIVITÀ ANTIDIABETICA

Gli estratti dei semi di *P.corylifolia* hanno mostrato un'attività antidiabetica nel caso di diabete mellito (Dhar et al., 2013) in quanto diminuiscono i livelli di glucosio nel sangue. Si pensa che questa azione sia dovuta al bacuchiolo ed alla psoralidina (Kim et al.,2005). Dallo studio è emerso che somministrazioni orali dell'estratto a dosi corrispondenti a 250 mg/Kg, provocano una caduta di zuccheri pari al 25.4% dopo quattro ore dall'assunzione. Questo significa che il continuo uso o un'accidentale overdose non provoca uno shock ipoglicemico. È stato inoltre osservato che l'estratto di *Psoralea* contiene concentrazioni apprezzabili di magnesio, potassio e calcio. Tutti e tre giocano un ruolo importante nel

mantenimento dei giusti livelli di glucosio nel sangue. Il Magnesio è responsabile dei meccanismi di trasporto dello zucchero nelle membrane cellulari ed è, inoltre, coinvolto sia nella secrezione che nell'attività dell'insulina. Il potassio è necessario per la secrezione di insulina, infatti l'ipocaliemia diminuisce la capacità di secernere insulina da parte delle cellule pancreatiche causando iperglicemia e problemi di insulino-resistenza. I livelli di calcio influenzano il rilascio di insulina in quanto stimolano il fattore di tolleranza del glucosio il quale diminuisce i livelli dello zucchero nel sangue.

STIMOLAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE OSTEOLASTICA

Nel 2001 Wang et al. hanno affermato che estratti di frutti di *Psoralea corylifolia* stimolano l'attività osteoblastica nelle colture cellulari di UMR106. Questa attività si pensa sia dovuta ai flavonoidi presenti nei frutti. Dallo studio è emerso che quando le colture cellulari vengono trattate con 4µg/mL di estratto etanologico l'attività osteoblastica aumenta del 32.2% rispetto al controllo.

L'attività osteoblastica è stimolata anche da un isoflavone, il neobavaisoflavone (Don et al., 2012) ottenuto da estratti metanolici dei semi di *P.corylifolia*. Il metabolita promuove l'osteogenesi in cellule MC3T3-E1 aumentando l'attività delle fosfatasi alcaline e l'espressione di proteine specifiche come la collagen I, l'osteocalcin (OCN) e la bone sialo protein (BSP). Inoltre il neobavaisoflavone promuove l'espressione sia del fattore di trascrizione 2 (RUNx2) che del fattore di trascrizione ossea-specifico osterix che partecipano alla regolazione dell'espressione dei geni marker delle ossa.

ATTIVITÀ ANTITUMORALE ED IMMUNOMODULATRICE

Gli estratti metanolici di semi di *P.corylifolia* hanno mostrato attività antitumorale ed immunomodulatrice in tumore indotto da cellule EAC (Erich ascites tumor) trapiantate in topi. L'estratto aumenta l'attività delle cellule NK. L'attività delle cellule NK è uno dei meccanismi citotossici non anticorpo dipendente presente nell'organismo umano. Le cellule NK provocano lisi in molte cellule tumorali. Inoltre l'estratto etanologico promuove l'attività ADCC delle cellule della milza (Latha et al., 2000).

Bronikowska et al. (2012) hanno dimostrato che la psoralidina, metabolita presente negli estratti di semi di *P.corylifolia*, ha un'attività citotossica in quanto induce apoptosi in cellule cancerose HeLa. L'attività del metabolita è dose-dipendente, infatti risultati positivi sono stati ottenuti utilizzando dosi comprese tra 20 e 50 μ M. È stato inoltre osservato che la psoralidina promuove l'attività del TRAIL fattore endogeno che induce apoptosi in cellule tumorali legandosi ai recettori (death receptors) TRAIL-R1/DRA4 e TRAIL-R2/DRA5. La combinazione di psoralidina e TRAIL promuove sia un aumento dell'espressione del recettore TRAIL-R2/DRA5 sia la depolarizzazione del potenziale di membrana dei mitocondri, incrementando l'attività citotossica verso le cellule tumorali HeLa.

Lo psoralene e l'angelicina, ottenuti tramite estrazione cloroformica da foglie di *P.corylifolia*, mostrano attività antitumorale *in vitro* contro la proliferazione delle cellule cancerose BGC-823. Questi composti mostrano un valore IC_{50} di 5.82 μ g/mL e 148.8 μ g/mL rispettivamente per lo psoralene e l'angelicina (Guo et al., 2003).

Nel 2009 Nam et al. hanno dimostrato che la frazione dell'estratto metanolico di *P.corylifolia* solubilizzata in acetato di etile induce il chinone reduttasi contro le cellule Hepa 1c1c7 del topo. L'enzima, appartenente alla classe delle ossido reduttasi, è un protettore della fase II e quindi blocca la generazione dei metaboliti mutageni e gli agenti cancerogeni del chinone.

ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA

L'estratto etanolico dei semi di *Psoralea corylifolia* mostra un'attività antinfiammatoria dovuta alla psoralidina. Nel 2011 Hee Jung Yang et al. hanno dimostrato che estratti di *P.corylifolia* hanno attività antiinfiammatoria su cellule sane esposte precedentemente a radiazioni ionizzanti (radioterapia) in quanto inibiscono COX-2 mediante la soppressione dell'attivazione del NF-KB dopo la fosforilazione dell'AkT e bloccando l'attività del 5-LOX. La radioterapia viene utilizzata, molto spesso, in caso di tumori inoperabili per uccidere le cellule cancerose. L'esposizione ai raggi, però, può danneggiare anche le cellule sane provocando, spesso, fenomeni infiammatori che possono degenerare con il tempo. Tutto questo suggerisce l'uso in vivo di *Psoralea* come preventivo degli effetti infiammatori indotti dalla radioterapia.

ATTIVITÀ ANTIAGGREGANTE PIASTRINICA

I flavonoidi isobavacalcone e neobavaisoflavone hanno attività antiaggregante piastrinica. L'isobavacalcone ha un'attività specifica contro l'aggregazione indotta dall'acido arachidonico con dose IC_{50} di 0.5 μM , mentre il neobavaisoflavone è attivo contro l'aggregazione piastrinica indotta sia dall'acido arachidonico, con dose IC_{50} 7. μM , sia dal PAF (fattore di aggregazione piastrinica) con dose IC_{50} 2.5 μM (Tsai et al., 1996).

ATTIVITÀ ESTROGENICA

I metaboliti presenti negli estratti esanici dei semi di *P.corylofolia* hanno mostrato una potente attività estrogenica in quanto riescono a legarsi ai recettori α e β dell'estrogeno. Gli isoflavonoidi hanno una struttura molto simile all'estrogeno. Oltre a questi troviamo anche il bacuchiol il quale risulta essere il componente che ha mostrato una maggiore affinità per entrambi i recettori. Questo estratto, se assunto in associazione a cure ormonali sostitutive, inibisce la formazione e proliferazione di cellule tumorali al seno che possono formarsi durante la terapia (Lim et al., 2011; Zhang et al., 2005).

ATTIVITÀ CITOTOSSICA

I semi di *P.corylifolia* hanno mostrato attività citotossica contro linee cellulari del carcinoma allo stomaco (SNU-1 e SNU-16) con una dose IC_{50} compresa tra 53 e 203 $\mu g/mL$ dovuta alla presenza della psoralidina (Yang et al., 1996).

L'estratto etanolic di *P.corylifolia* ha attività citotossica verso le cellule L929. Questa attività è dovuta al bacuchiol (Kombo et al., 1989).

ATTIVITÀ EPATOPROTETTIVA

Il bacuchiol insieme allo psoralene, isolati dall'estratto acquoso dei semi di *P.corylifolia*, hanno mostrato attività epatoprotettiva con valore EC_{50} rispettivamente di 1.0, 47.0 e 50.0 $\mu g/mL$ su cellule epatiche Hep G2 precedentemente trattate con tacrina (Cho et al., 2001).

4.3. Attività farmacologica dei metaboliti di *Bituminaria bituminosa*

Su *B.bituminosa*, in passato, non sono stati effettuati molti studi ma oggi possiamo affermare che la bituminosa è una pianta che sta sorprendendo per le diverse attività farmacologiche che possiedono i suoi metaboliti secondari. I flavonoidi prodotti dalla pianta hanno mostrato, sia *in vitro* che *in vivo*, attività epato-protettive, anti-allergiche, anti-infiammatorie e antitumorali (M.G.L. Hertog et al., 1993; Rimm et al., 1996; Havsteen et al., 2002). Erybraedina C, uno degli pterocarpani presenti in molte parti della pianta, ha una forte attività citotossica verso le cellule umane in quanto, essendo un inibitore catalitico della topoisomerasi I, (Tesauro et al., 2010) impedisce sia la duplicazione del DNA, sia la sintesi proteica. L'azione del metabolita è dose dipendente. Grazie alla sua struttura chimica ed alla disposizione dei gruppi funzionali l'erybraedina C può interagire o con il solo enzima, legandosi al sito attivo ed impedendo l'apertura della doppia elica del DNA, o con il complesso DNA-enzima impedendo la chiusura del DNA. Il metabolita ha attività irreversibile (Tesauro et al., 2010). Grazie alla sua conformazione ha anche un elevato potere antiossidante. L'eribraedina C insieme alla bitucarpina A inducono apoptosi nelle cellule del colon con adenocarcinoma (HT29 e LoVo) (Maurich. Et al., 2006). Maurice et al. (2004) hanno dimostrato che eribraedina C e bitucarpina A non hanno un'attività clastogenica verso i linfociti umani e non alterano né il loro ciclo cellulare, né il loro indice mitotico. I due pterocarpani però, influenzano l'attività clastogenica della mitomicina C e della bleomicina, antibiotici utilizzati in clinica come agenti alchilanti che inibiscono la divisione delle cellule tumorali legandone il DNA e provocandone la frammentazione. I due metaboliti inibiscono l'attività clastogenica della mitomicina C e della bleomicina nei linfociti umani chelando metalli come il Fe^{2+} o il Cu^{2+} , capaci di catalizzare reazioni di ossido riduzione che portano all'attivazione dei due farmaci i quali non sono di per se attivi. La bleomicina e la mitomicina hanno una forte affinità verso i metalli e formano con essi dei complessi che vanno ad attaccare il desossiribosio del DNA in posizione C4' provocando alla fine una modificazione del DNA stesso.

Per osservare l'attività anti-clastogenica *in vitro* dei due pterocarpani è necessaria un' ora di incubazione del metabolita prima dell'introduzione del farmaco nella coltura. A causa

della struttura chimica, l'attività dell'eribraedina C è maggiore rispetto a quella della bitucarpina A. Questo è dovuto alla sostituzione, nella plicatina, dei due gruppi ossidrilici con due gruppi metossilici ed alla perdita di un gruppo prenile in posizione 5'. Il cambiamento della struttura conferisce al metabolita una minore polarità e quindi una diminuzione sia dell'attività biologica che del potere chelante. Solo l'eribraedina C, ha un'azione protettiva contro il danneggiamento del DNA indotto da bleomicina e mitomicina C.

Gli pterocarpani, essendo dei derivati degli isoflavoni, hanno un elevato potere antiossidante. L'integrazione con la dieta di questi prodotti aiuta a prevenire problemi cardiovascolari, vari tipi di cancro, disordini epatici ed infiammazioni.

La Plicatina B, essendo un composto con elevato potere antiossidante, ha la capacità di andare ad inibire il processo di ossidazione delle LDL grazie ad una serie di reazioni, tra cui una chelazione del Cu^{2+} (Turchi et al., 2009). L'ossidazione delle LDL (lipoproteina a bassa densità) è un prerequisito per l'accumulo di colesterolo sia nelle cellule umane sia nei vasi sanguigni che porta alla formazione di placche aterosclerotiche e di conseguenza a problemi circolatori e cardiovascolari.

5. LA SIMBIOSI MICORRIZICA

5.1. Le simbiosi micorriziche

Per simbiosi si intende, secondo il significato attribuito da De Bary (1879), la vita in comune tra organismi diversi che coesistono tra di loro; il termine assume successivamente la connotazione di associazione tra organismi dissimili, dalla quale essi traggono mutuo beneficio (Smith e Douglas, 1987).

Le associazioni simbiotiche, che si instaurano tra migliaia di specie di funghi del suolo e le radici della gran parte delle piante terrestri, costituiscono le micorrize. Si tratta di rapporti mutualistici, di reciproco vantaggio per gli organismi coinvolti: la pianta fornisce ai funghi simbionti gli zuccheri prodotti attraverso la fotosintesi clorofilliana indispensabili per il loro metabolismo, dato che essi non sono in grado di sintetizzarli essendo organismi chemioeterotrofi; a loro volta i funghi micorrizici, assorbendo gli elementi minerali presenti nel suolo, e fornendoli alle radici della pianta, favoriscono un migliore stato nutrizionale della stessa (Giovannetti e Avio, 2002).

Oltre al ruolo di fertilizzanti biologici, i funghi micorrizici esercitano un'azione di protezione nei confronti di stress abiotici e biotici (Whipps, 2004; Augé, 2001; Evelin et al., 2009).

Il termine micorriza fu utilizzato per la prima volta nel lontano 1885 da Albert Bernhard Frank, patologo tedesco, per definire l'associazione tra fungo e pianta, sebbene fosse già stata osservata fin dal 1847 da Reissek che descrisse la presenza di ife fungine nelle cellule radicali di diverse angiosperme.

Frank, descrisse per la prima volta la struttura ed il funzionamento essenziale del rapporto simbiotico fra alberi e funghi che chiamò *mykorhiza*. Il principale carattere strutturale che egli riuscì ad osservare fu la costante presenza di una sorta di rivestimento o mantello, costituito da un intreccio ifale, intorno agli apici radicali. Il patologo tedesco osservò inoltre che queste strutture erano sempre presenti nei sistemi radicali delle piante in ambienti naturali. In effetti, è noto che più dell' 80% delle specie vegetali in condizioni naturali è micorrizzato. Sono stati inoltre ritrovati resti fossili che confermano l'esistenza delle micorrize già 460 milioni di anni fa, in concomitanza con l'apparizione dei vegetali

sulle terre emerse. Al contrario, negli ambienti antropizzati, le micorrize sono spesso assenti oppure presenti in forma molto ridotta, molto probabilmente a causa dell'inquinamento dei terreni (Giovannetti e Gianinazzi-Pearson, 1994; Jansa et al., 2002). Le simbiosi micorriziche differiscono tra loro per aspetti fisiologici e morfologici a seconda delle specie vegetali e fungine coinvolte. I tipi principali sono rappresentati dalle ectomicorrize, ectoendomicorrize ed endomicorrize.

Le ectomicorrize portano alla formazione di uno spesso mantello fungino intorno alle radici della pianta, la "rete di Harting", senza colonizzare le cellule radicali; si trovano molto spesso nelle specie forestali di zone temperate e boreali, come in *Castanea*, *Quercus*, *Pinus*, *Corylus*, *Betula*, *Ulmus* e *Larix*. I simbionti fungini sono rappresentati soprattutto da Basidiomiceti, come *Amanita*, *Boletus*, *Russula*, e da Ascomiceti come il genere *Tuber*.

Le ectoendomicorrize si distinguono dalle ectomicorrize in quanto il fungo riesce a crescere intracellularmente nel primo strato di cellule radicali ma è comunque presente il manto fungino esterno. Si possono trovare in vari generi delle Ericales, come *Arbutus*, e sono note come micorrize arbutoidi.

Le endomicorrize si suddividono in tre diverse tipologie: le micorrize ericoidi, orchidoidi e arbuscolari. Le micorrize ericoidi tipiche di terreni acidi e di elevate latitudini, si rinvencono in alcune Ericales, come *Erica*, *Calluna*, *Rhododendron*, *Vaccinium*. I più frequenti isolati fungini sono forme di Ascomiceti, tra cui *Hymenoscyphus ericae*. Si sviluppano in habitats in cui i nutrienti si trovano principalmente sotto forma organica. I funghi permettono una mobilitazione delle sostanze al fine di renderle utilizzabili dalla pianta. Le micorrize orchidoidi si sviluppano a partire dallo stadio giovanile delle Orchidaceae, il protocorm; i funghi simbionti, tra cui Basidiomiceti come *Rhizoctonia* e *Armillaria*, procurano carbonio e vitamine alle plantule in sviluppo.

I tipi micorrizici predominanti in determinate condizioni ambientali e pedologiche mostrano una stretta correlazione con i principali biomi terrestri. Negli ambienti con condizioni estreme sono più frequenti le micorrize ericoidi, seguite dalle ectomicorrize; al contrario le micorrize arbuscolari hanno una maggiore diffusione nelle aree temperate e tropicali, nelle quali il fosforo rappresenta il principale fattore limitante la crescita dei vegetali. Le comunità vegetali e la competizione tra piante sono influenzate dalla distribuzione dei funghi micorrizici, così come risulta incrementata la diversità floristica. Le micorrize rappresentano inoltre un importante fattore di trasferimento di nutrienti e di

redistribuzione delle risorse all'interno delle comunità vegetali e fungine, costituendo un ponte tra le piante collegate da un comune micelio extraradicale (Simard et al., 1997).

5.1.1. Le micorrize arbuscolari

Le micorrize arbuscolari sono presenti in tutti gli ecosistemi vegetali e mostrano una distribuzione universale, essendosi adattate ai più diversi climi e habitat, coinvolgendo l'80% delle specie vegetali. Il termine arbuscolare deriva dalle strutture austoriali, gli arbuscoli, che le ife fungine formano all'interno delle cellule radicali della pianta ospite. Ad occhio nudo tuttavia non si riesce a percepire se l'apparato radicale di una pianta sia o meno colonizzato: è infatti necessaria una colorazione differenziale delle strutture fungine ed un'analisi al microscopio.

Originariamente il termine usato per descrivere tali associazioni era micorrize vescicolo-arbuscolari (VAM), ma dopo che fu osservato che non tutti i generi e specie di funghi avevano la capacità di formare le vescicole all'interno delle radici, fu preferito adottare la definizione di micorrize arbuscolari.

Le micorrize arbuscolari rappresentano un successo in termini evolutivi in quanto sulla base dei ritrovamenti di resti fossili e dei dati relativi alle sequenze del DNA, si è potuto mostrare che esse si sono originate all'inizio della storia delle piante terrestri. Il più antico ritrovamento di simbiosi micorriziche è stato quello di alcuni fossili di arbuscoli e ife, molto simili a quelli dei membri del phylum Glomeromycota, trovati in una pianta primitiva *Aglaophyton major*, risalente al periodo Devoniano inferiore, 400 milioni di anni fa (Remy et al., 1994). Questa scoperta ha confermato la teoria di alcuni autori che considerano i funghi micorrizici fondamentali per la colonizzazione delle terre emerse da parte delle piante (Simon et al., 1993). Recentemente, sono state ritrovate spore e ife fortemente somiglianti a quelle dei funghi AM attuali, nelle rocce delle montagne del Wisconsin, risalenti al periodo Ordoviciano, 460 milioni di anni fa (Redecker et al., 2000). Attualmente le micorrize arbuscolari, possono essere considerate ubiquitarie data l'ampia distribuzione geografica e la loro capacità potenziale di adattamento ecologico nei diversi habitat. Si possono infatti ritrovare nelle regioni artiche e subartiche, nelle foreste temperate e in quelle tropicali, nelle praterie, nella macchia e negli ecosistemi desertici, ed anche nelle dune sabbiose e negli ecosistemi alpini (Giovannetti e Avio, 2002).

5.1.2. I funghi micorrizici arbuscolari

I funghi micorrizici arbuscolari (AM) sono funghi del suolo appartenenti al phylum Glomeromycota e vengono considerati come biotrofi obbligati, in quanto non riescono a sviluppare un'estesa rete miceliare e a completare il ciclo vitale in assenza della pianta ospite (Giovannetti, 2000). Il micelio che sviluppano è cenocitico, ovvero privo di setti, e al suo interno i nuclei si muovono liberamente.

I funghi AM sono praticamente ubiquitari, in quanto sono diffusi sia nelle regioni artiche che nelle antartiche, sia nelle regioni temperate che tropicali, sia nelle macchie che nei deserti, sia nelle dune sabbiose che nelle regioni montane.

Lo sviluppo delle micorrize arbuscolari è basato essenzialmente su due componenti principali: il suolo in cui sviluppano il micelio extraradicale e la radice su cui differenziano strutture di adesione e colonizzazione.

I funghi AM, per il loro ruolo di interfaccia tra le piante - produttori primari - ed il sistema suolo, svolgono un ruolo cruciale nella fertilità dei suoli e nella nutrizione dei vegetali. Essi possono quindi rivestire un importante ruolo nella gestione dei sistemi agricoli come agenti di biofertilizzazione.

Il successo del loro possibile utilizzo dipende però dalla selezione di parametri adeguati a garantire un'elevata performance degli isolati di funghi AM. Tra questi, di particolare interesse sono le caratteristiche di infettività ed efficienza dei singoli isolati, che garantiscono una rapida colonizzazione radicale ed un'elevata capacità di assorbimento dei nutrienti e, pertanto, una risposta positiva in termini di crescita della pianta ospite.

La comunità di funghi AM presente nel suolo si modifica notevolmente al variare dell'ospite vegetale, delle condizioni ambientali e delle pratiche colturali tra le quali l'utilizzo di fertilizzanti ed erbicidi. Come conseguenza di questa pressione selettiva la composizione delle popolazioni fungine varia a seguito della selezione dei funghi AM più resistenti (Giovannetti e Gianinazzi-Pearson, 1994).

5.1.3. Piante ospiti

L'80% delle specie vegetali e la maggior parte delle piante coltivate possono formare simbiosi micorriziche tanto che “è più facile elencare le famiglie di piante in cui non si conosce siano presenti piuttosto che compilare una lista di famiglie in cui esse sono state trovate” (Gerdemann, 1968). I simbionti AM, seppur mostrando una specificità funzionale, non presentano una specificità d'ospite: una singola specie fungina può colonizzare centinaia di specie diverse ed una specie vegetale può essere colonizzata da diverse specie di funghi micorrizici.

Si sviluppano simbiosi micorriziche in tutti phyla vegetali: nelle Briofite, in gran parte delle Pteridofite, nelle Gimnosperme e nella maggior parte delle Angiosperme. All'interno di quest'ultimo phylum, i funghi AM sono equamente distribuiti tra monocotiledoni e dicotiledoni (Trappe, 1987).

Non sono state rinvenute simbiosi AM nelle Brassicaceae, Chenopodiaceae, nel genere *Lupinus* (appartenente alle Fabaceae), in molte Cyperaceae e in quelle specie che costituiscono degli ospiti esclusivi per gli altri funghi micorrizici (Ectomicorrize, Ectendomycorrize, Endomycorrize, Ericoidi e Orchidaceae).

La maggior parte delle specie vegetali di interesse agrario, come cereali, leguminose, alberi da frutto, specie orticole, girasole, tabacco, cotone, canna da zucchero, formano micorrize arbuscolari.

A seconda delle specie di piante ospiti si possono riscontrare due gruppi anatomici di colonizzazione micorrizica arbuscolare: il tipo *Arum* ed il tipo *Paris*. Il tipo *Arum* è il più diffuso ed è caratterizzato dall'espansione del fungo AM attraverso lo spazio apoplastico tra le cellule radicali corticali. Le vescicole sono intercellulari o intracellulari e gli arbuscoli sono prodotti all'apice dei rami ifali intracellulari. Il tipo *Paris* è caratterizzato dall'assenza delle ife intercellulari e da uno sviluppo simplastico del fungo che si espande da una cellula all'altra entro il cortex e forma molti coils ifali intracellulari e arbuscoli inseriti lungo i coils. La formazione dell'infezione AM di tipo *Arum* o *Paris* sembra essere sotto il controllo genetico della pianta ospite (Gerdemann, 1965; Jacquelinet-Jeanmougin e Gianinazzi-Pearson, 1983; Brundett e Kendrick, 1990; Bedini et al., 2000).

5.1.4. Ciclo biologico

Il ciclo di vita dei funghi AM non può essere completato senza la pianta ospite e per questo i funghi vengono definiti biotrofi obbligati.

Molte specie fungine producono spore nel suolo che sono capaci di germinare e crescere, se presenti adeguate condizioni, ma non sono capaci di produrre un micelio esteso in assenza dell'ospite e la loro crescita cessa dopo 15-20 giorni dalla germinazione se non instaurano una simbiosi funzionale con la radice (Giovannetti, 2000). Alcuni funghi AM dei generi *Glomus* e *Acaulospora* differenziano vescicole, strutture globose di diametro di 50-100 µm formate dentro il cortex radicale, di solito intercellularmente, contenenti lipidi e per questo considerate organi di riserva.

Il ciclo inizia con la germinazione di spore fungine quiescenti che, in condizioni ottimali di temperatura, umidità e pH, danno origine ad un micelio pre-simbiotico (dai 50 ai 200 µm), non in grado di crescere ulteriormente senza pianta ospite.

Il micelio pre-simbiotico riesce a riconoscere i segnali chimici emessi dalla radice dell'ospite, costituiti prevalentemente da composti fenolici e flavonoidi, di peso non superiore ai 500 daltons (Giovannetti et al., 1996). Recentemente sono stati individuati come i possibili stimolanti della crescita fungina alcuni terpeni rilasciati dalle piante e identificati come strigolattoni, ormoni vegetali implicati anche nella germinazione di semi di piante parassite (Akiyama et al., 2005).

Con il riconoscimento dell'ospite ha inizio la fase di morfogenesi differenziale che porta ad un blocco della dominanza apicale e ad una maggiore ramificazione ifale.

La morfogenesi differenziale del micelio viene indotta solo in presenza degli essudati emessi dalla pianta ospite; la mancanza di tali segnali non induce modificazioni nella crescita ifale (Giovannetti et al., 1994).

In presenza di una potenziale pianta ospite avvengono cambiamenti morfogenetici che portano ad una differenziazione degli appressori multinucleati, strutture infettive allargate che aderiscono alla radice e permettono al fungo di introdursi nella radice stessa. Queste strutture testimoniano l'avvenuto riconoscimento, in quanto la loro formazione avviene entro 36-48 ore dall'interazione tra i due differenti organismi. Possono esserci, tuttavia, dei casi di resistenza in piante ospiti nelle quali la differenziazione degli appressori da parte

del fungo provoca una reazione di difesa con il rilascio di sostanze fenoliche sulla parete cellulare (Gollotte et al., 1993).

Il numero e la velocità di formazione degli appressori sono influenzati dalle condizioni in cui avviene il processo simbiotico avviene e dalle combinazioni fungo-pianta.

Dagli appressori si originano delle ife di penetrazione che si sviluppano longitudinalmente all'asse radicale in modo intercellulare; ramificandosi e penetrando all'interno delle cellule radicali portando alla formazione degli arbuscoli.

Gli arbuscoli svolgono un importante ruolo nella simbiosi dei funghi AM; infatti è attraverso la presenza di tali strutture che si riesce a discriminare il phylum dei Glomeromycota. Possono essere definiti come austeri intracellulari che si originano dalla ramificazione dicotomica dell'ifa che man mano riduce il proprio diametro fino a formare ife sempre più sottili e con un contenuto di chitina decrescente assumendo complessivamente una caratteristica struttura ad alberello. Il fungo si localizza al di fuori del citoplasma cellulare dell'ospite, infatti l'arbuscolo è sempre circondato da una membrana della cellula vegetale, la membrana periarbuscolare o PAM, altamente specializzata nel trasferimento di nutrienti tra i simbionti. Gli arbuscoli sono responsabili di un consistente incremento nella superficie di contatto tra fungo e pianta e costituiscono il sito di passaggio dei nutrienti assorbiti dal suolo (P, Zn) da parte del fungo, alla pianta. Il loro sviluppo avviene in relazione alla luce e allo stato fenologico e nutritivo della pianta ospite.

Gli arbuscoli cominciano a formarsi dopo 42h dal contatto tra fungo-pianta ospite nelle vicinanze del sito di penetrazione.

Lo sviluppo degli arbuscoli è influenzato da diversi fattori quali lo stato nutritivo e fenologico dell'ospite e la luce (Smith e Gianinazzi-Pearson, 1988). La vita degli arbuscoli è molto breve, inferiore ai 15 giorni. In 7-10 giorni si formano, degenerano, si svuotano e collassano, formando masse amorfe, ben visibili al microscopio elettronico, nella cellula ospite che sopravvive.

Successivamente all'instaurarsi della simbiosi si osserva l'accrescimento di una rete miceliare esterna alla radice, il micelio extraradicale, che oltre a consentire l'assorbimento dei nutrienti dal terreno contribuisce all'aggregazione delle sue particelle. La rete ifale è dimorfica, ovvero composta da ife di diverso spessore e diametro: ife grosse (8-20 μm) e ife fortemente ramificate che costituiscono un'efficiente struttura assorbente. L'ampiezza

del micelio extraradicale è influenzata dall'entità della colonizzazione intraradicale, dalle condizioni ambientali e dallo stato dell'ospite.

L'accrescimento del micelio extraradicale comincia dopo la penetrazione fungina nella radice, in particolare dopo la formazione degli appressori. La crescita extraradicale del micelio può infatti precedere la formazione degli arbuscoli all'interno delle cellule; le condizioni del suolo possono a loro volta influenzare lo sviluppo ifale: alti livelli di P possono ridurre la crescita del micelio (Abbot et al., 1984).

Le ife esterne possono essere considerate una delle principali fonti d'inoculo per la colonizzazione radicale. È stata evidenziata una relazione lineare tra il numero di punti d'ingresso nella radice e la densità di propaguli nel suolo, così come tra la colonizzazione radicale e la densità di propaguli (Smith e Walker, 1981).

Con il procedere dell'infezione radicale possono formarsi strutture, intra o extracellulari, a parete spessa, di forma ovoidale con diametro compreso tra 50 e 100 µm: le vescicole. Esse sono considerate organi di riserva all'interno dei frammenti radicali in quanto contengono prevalentemente lipidi e nuclei. I generi *Scutellospora* e *Gigaspora* non producono vescicole ma formano cellule ausiliarie sul micelio extraradicale. La formazione di vescicole dipende dalle condizioni ambientali soprattutto dalla presenza di P.

Le ife esterne possono produrre spore dormienti o immediatamente germinabili nel terreno. All'aumentare della concentrazione di P, non si riduce solo la colonizzazione radicale, ma anche il numero di spore prodotte.

Le spore sono la fonte d'inoculo meglio determinabile e gli unici propaguli dai quali è possibile risalire alla specie. Solitamente la densità di spore è direttamente correlata alla colonizzazione radicale. Le spore dei funghi AM contengono molti nuclei e grandi quantitativi di lipidi e carboidrati costituendo quindi degli organi di riserva e di accumulo sia di informazioni genetiche che di energia sotto forma di gocce lipidiche, glicogeno, trealosio e corpi proteici. Il trealosio viene rapidamente mobilizzato quando la spora germina e supporta la crescita iniziale del micelio pre-simbiotico a differenza dei lipidi che svolgono i loro effetti in tempi più lunghi. Alcune specie di funghi producono spore in grado di sopravvivere in situazioni in cui la germinazione non è immediatamente seguita dall'instaurarsi della simbiosi. Mantengono quindi a lungo la loro infettività grazie al livello di accumulo di riserve energetiche

5.2. Rapporti fungo-pianta: gli effetti dei funghi AM

5.2.1. Traslocazione di C al fungo

La traslocazione dei nutrienti minerali, assorbiti dal fungo, alla pianta e di zuccheri dalla pianta al fungo, costituisce la base del rapporto mutualistico su cui si fondano le simbiosi micorriziche arbuscolari. Il carbonio organico, che il fungo riceve, è necessario alla produzione della rete fungina nel suolo. All'interno delle spore e del micelio sono stati rilevati trealosio e polioli composti in cui viene trasformato il glucosio ottenuto dalla pianta. Il sito di trasferimento del C è probabilmente situato sulle ife intercellulari piuttosto che in corrispondenza degli arbuscoli. Sono state rilevate le H^+ ATPasi principalmente sulle ife intercellulari. La quantità di carbonio trasferito dall'ospite vegetale al fungo AM varia tra il 4 ed il 20% del carbonio atmosferico fissato e dipende dalle diverse combinazioni pianta-fungo.

5.2.2. Traslocazione di nutrienti alla pianta

Tra i principali benefici che la pianta ospite riceve dalla simbiosi mutualistica con i funghi AM ritroviamo un considerevole miglioramento della nutrizione minerale. Questo incremento è dovuto alla presenza di un apparato assorbente ausiliario, costituito dalle ife fungine, più competitivo rispetto alle radici grazie al loro diametro inferiore in grado di penetrare in pori di minori dimensioni e per la capacità di superare la zona di esaurimento dei nutrienti minerali, in prossimità dell'apparato radicale. Il micelio fungino è inoltre più competitivo rispetto ai batteri del suolo e alle radici per l'assorbimento del fosforo solubile. L'incremento della crescita delle piante ospiti è imputabile all'aumento dell'assorbimento del P. Le ife fungine riescono ad apportare una maggiore quantità di P alla pianta perché esplorano quella parte di suolo non raggiunta dalle radici.

Grazie all'assenza di setti di separazione nel micelio, risulta facilitato il rapido trasferimento delle sostanze nutritive all'interno delle ife. Il trasferimento del P è abbastanza complesso in quanto una volta assorbito viene "stoccato" all'interno di vacuoli

ifali sottoforma di granuli di polifosfato i quali verranno trasportati dalle ife esterne alle ife interne e rilasciati all'interno degli arbuscoli. Grazie alle polifosfatasi ed alla fosfatasi alcaline verrà rilasciato il P.

Le micorrize arbuscolari migliorano l'assorbimento dell'N favorendo anche l'attività di microrganismi liberi come *Azotobacter* e *Azospirillum*, in grado di fissare N₂ atmosferico. Le micorrize favoriscono le associazioni simbiotiche con *Rhizobium*. La simbiosi tra rizobi e leguminose è fortemente influenzata dai funghi AM in quanto i noduli delle radici delle leguminose contengono comunità di funghi AM. L'incremento della nutrizione fosfatica, risultante dalla colonizzazione micorrizica, porta ad una migliore nodulazione e fissazione dell'azoto.

Il micelio di funghi AM costituisce un'interconnessione tra le piante portando ad una redistribuzione dei nutrienti disponibili. Oltre al trasporto e all'assorbimento di N riveste un importante ruolo per la temporanea immobilizzazione del nutriente nella biomassa fungina consentendo anche la sua mineralizzazione in occasione della decomposizione del micelio (Jeffries e Gianinazzi, 2003).

Notevoli sono le differenze tra le piante ospiti per ciò che riguarda la loro dipendenza micorrizica. Ad esempio *Citrus* è totalmente dipendente dalla simbiosi con funghi AM, nella fase giovanile, mentre alcune specie erbacee sono del tutto indipendenti. La dipendenza micorrizica varia in relazione al tipo di apparato radicale della pianta ospite, e in base all'entità di peli radicali presenti (Baylis, 1975).

5.2.3. Effetti non nutrizionali dei funghi AM

I funghi AM contribuiscono a migliorare la struttura del suolo prevenendo la lisciviazione dei nutrienti e i fenomeni di erosione, favorendo la penetrazione delle radici nel suolo e le pratiche di lavorazione del terreno. Il processo di aggregazione avviene tramite l'azione fisica del micelio il quale trattiene le particelle grazie alle ife, e attraverso la produzione di una glicoproteina, la glomalina, che si accumula nel suolo sotto forma di una sostanza proteica chiamata glomalin related soil protein (GRSP) in quantità variabili tra 2,8 ed i 14,8 mg/g (Wright e Upadhyaya 1996; Rillig, 2004). È stata dimostrata una relazione

diretta tra lo sviluppo delle ife extraradicali e l'aggregazione del suolo (Van der Heijden et al., 2006).

La glomalina può essere utilizzata come indicatore utile alla valutazione della fertilità biologica del suolo, mostrandosi sensibile alle diverse pratiche agricole (Bedini et al., 2007).

Le piante micorrizate sono più resistenti alle carenze idriche, grazie ad un migliore flusso d'acqua attraverso le ife; sono più tolleranti ai patogeni del suolo, per mezzo di un generale miglioramento dello stato nutrizionale e della possibile presenza di una popolazione di microrganismi antagonisti localizzati sia sulle spore che sulle ife fungine (Azcon-Aguilar e Barea, 1996). È stato dimostrato che *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae* incrementano la resistenza di piante di tabacco e pomodoro nei confronti di patogeni radicali (Baltrushat e Schönbeck, 1975).

I meccanismi di difesa dai patogeni sono molteplici; tra i principali ritroviamo l'esclusione attraverso la quale il fungo micorrizico, che colonizza le cellule radicali, esclude la presenza del patogeno da tali cellule. Si ha una difesa più efficace quando la colonizzazione micorrizica si sviluppa prima dell'attacco da parte del patogeno. Altri meccanismi d'azione comprendono la cosiddetta resistenza indotta la quale provoca cambiamenti nei metodi di difesa vegetale accelerando la risposta difensiva da parte della pianta (Gosling et al., 2006).

I funghi micorrizici, oltre a instaurare simbiosi benefiche con molte specie vegetali, possono svolgere un'azione depressiva nei confronti delle specie ruderali, tra cui si collocano numerose infestanti. Da qui l'ipotesi che i funghi AM abbiano le potenzialità di sopprimere la crescita di infestanti dannose alle specie coltivate. In recenti lavori, il girasole (*Helianthus annuus*) è stato fatto crescere insieme alle infestanti ed è stata notata una riduzione della biomassa di alcune infestanti in presenza di funghi AM che riescono ad incrementare l'abilità competitiva del girasole (Van der Heijden et al., 2008).

È necessario infine considerare come i benefici apportati dai funghi AM non si limitino all'incremento di produzione delle colture ma contribuiscano a migliorare la qualità del suolo, strettamente dipendente dalla presenza e dalla diversità degli organismi nell'agroecosistema (Bethlenfalvay e Schüepp, 1994). I funghi micorrizici, infatti, interagiscono con le altre comunità microbiche, funzionando come mediatori nel flusso di

[Digitare il testo]

C e nutrienti costituendo un accumulo di C nella biomassa ifale contribuiscono ad incrementare il contenuto di sostanza organica nel terreno.

5.3. Effetti della simbiosi micorrizica sulla produzione di metaboliti secondari in piante medicinali

La colonizzazione delle cellule corticali delle radici con funghi micorrizici, oltre a stimolare l'aumento dell'area delle foglie, della lunghezza delle radici, della biomassa della pianta (Ceccarelli et al., 2010; Prasad et al., 2011; Giovannetti et al. 2012), del contenuto di clorofilla e carotenoidi (Baslam et al., 2011), può provocare cambiamenti sia citologici che metabolici come la stimolazione dei plastidi durante la formazione arbuscolare (Fester et al. 2001, Hans et al. 2004, Lohse et al. 2005). L'attivazione della via biosintetica dei plastidi e del ciclo di Krebs promuove sia l'aumento dell'attività metabolica della pianta che l'aumento della produzione di amminoacidi e di precursori dei metaboliti (Lohse et al.2005). La simbiosi micorrizica quindi influenza la produzione e l'accumulo, nella pianta ospite, dei metaboliti primari e secondari inducendo importanti cambiamenti sia nelle attività enzimatiche (superossidodismutasi e catalasi), sia nei meccanismi fisiologici che regolano l'accumulo dei metaboliti secondari (Fester et al., 2005).

Gli studi fitochimici si sono soffermati principalmente sull'analisi della variazione, in seguito a micorrizzazione, di due classi di metaboliti secondari: terpeni e composti fenolici.

5.3.1. Effetto della simbiosi micorrizica sui terpeni e sui loro derivati

I terpeni ed i terpenoidi (isoprenoidi) sono i principali costituenti degli olii essenziali estratti da molte piante medicinali. Molti studi hanno dimostrato che il contenuto dei metaboliti presenti negli olii essenziali aumenta in seguito ad inoculazione con i funghi AM. Nel 2011 Prasad et al. hanno affermato che la concentrazione del linalol, nell'olio essenziale di *Ocimum basilicum* aumenta in seguito ad elicitazione con *Glomus intraradices*.

Nel 2002 Gupta et al. hanno determinato un aumento del 103% rispetto al controllo del contenuto di terpeni in *Mentha arvensis* in seguito ad elicitazione con *Glomus fasciculatum* e *Glomus lamellosum*. Nel 2006 Coppetta et al. hanno confermato l'aumento dei terpeni

(33,33% rispetto al controllo) nell'olio essenziale di *Ocimum basilicum* in seguito a micorrizzazione con *Glomus mosseae*.

L'aumento del 128% e del 143% della produzione rispettivamente di geraniolo e linalolo in *Coriandrum sativum* in seguito ad elicitazione con *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae* è stata determinato da Kapoor et al nel 2002.

Nel 2007 Liu et al hanno dimostrato che il contenuto dell'acido glicirrizico, saponina triterpenica, presente nella *Glycyrrhiza*, aumenta del 10% dopo 4 mesi e del 20% dopo 30 mesi rispetto al controllo in seguito a micorrizzazione.

5.3.2. Effetto della simbiosi micorrizica sui composti fenolici

La simbiosi micorrizica promuove l'accumulo e la produzione dei composti fenolici.

Ceccarelli et al (2010) hanno dimostrato che la colonizzazione con *Glomus intraradices* induce un accumulo dei polifenoli totali nelle foglie di *Cynara cardunculus* sia durante la crescita in vaso sia dopo trasferimento in campo aperto. L'aumento della produzione dei composti fenolici è stato determinato anche in *Catharanthus roseus* in seguito ad elicitazione con varie specie del genere *Glomus* (Rosa-Mera et al 2001). Essendo i polifenoli responsabili, insieme ai flavonoidi, dell'attività antiossidante delle piante dallo studio di Ceccarelli et al.(2010) è emerso anche un aumento del potere antiossidante delle foglie di carciofo in seguito ad elicitazione con il fungo micorrizico. Fester et al. (2005) hanno riportato un aumento nelle radici delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) suggerendo che le piante micorrizzate rispondono a stress ossidativi con l'accumulo dei enzimi antiossidanti.

L'elicitazione con *Glomus mosseae* promuove un significativo incremento della concentrazione dell'acido rosmarinico e dell'acido caffeico nell'*Ocimum basilicum* (Toussaint et al., 2007) e dei flavonoidi in *Salvia miltiorrhiza* (He et al.,2009; Meng et al., 2001) ed in *Bupleurum chinese* (Teng and He 2005).

Un aumento della produzione di cumarine, rispetto al controllo, è stato determinato in *Angelica dahurica* (Zahao and He 2011; Zahao et al.2009) in seguito ad elicitazione con micorrize.

La micorrizzazione con *Glomus intraradices* promuove l'accumulo dell'acido fenolico in *Arnica montana* (Jurkiewicz et al 2010), dell'acido desquiterpenico in *Valeriana officinalis* (Nell et al.2010) e dei derivati del timolo in *Inula esinfolia* (Zubek et al. 2010). Non sempre, però, la simbiosi micorrizica porta ad un aumento nella produzione dei derivati fenolici; infatti nelle radici di *Salvia officinalis* non promuove l'accumulo dell'acido rosmarinico (Nell et al. 2010). Geneva et al (2009), inoltre, evidenziano una drastica diminuzione sia dell'accumulo di polifenoli totali che dei flavonoidi nelle foglie di *Salvia officinalis* dopo micorrizzazione.

6. SCOPO DEL LAVORO

La necessità di garantire al mercato farmaceutico un approvvigionamento costante di composti chimici naturali ad attività farmacologica ha spostato l'interesse di molti ricercatori verso nuove metodologie di produzione per la standardizzazione delle rese. Uno dei ruoli delle biotecnologie delle piante officinali è anche questo. Studi precedenti hanno dimostrato che l'elicitazione con funghi AM non solo promuove un aumento della biomassa della pianta, ma anche la produzione e l'accumulo di metaboliti secondari. Le micorrize arbuscolari sono presenti in tutti gli ecosistemi vegetali e coinvolgono l'80% delle specie vegetali promuovendo un maggior apporto di sostanze nutritive alla pianta favorendo quindi una maggior produzione di metaboliti sia primari, che secondari.

I principi attivi presenti in *B.bituminosa* mostrano numerose attività di interesse farmaceutico come attività antiinfiammatorie, antitumorali, antibatteriche e antifungine antilipemiche.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare se la stimolazione, in vaso, con funghi micorrizici conosciuti, *Glomus intraradices* (IMA5) e funghi indigeni (ELBA) presenti nel terreno dove cresce spontaneamente la pianta, inducono una maggior produzione dei principali metaboliti già ritrovati nella pianta (erybraedina C, bitucarpna A, plicatina B, psoralene, angelicina e geisteina) rispetto al controllo non micorrizzato. Oltre ai principali metaboliti è stato valutato l'aumento o la diminuzione di clorofilla, carotenoidi, flavonoidi e polifenoli totali. Le piante cresciute in vaso sono state confrontate con le piante spontanee raccolte all'Isola d'Elba.

7. MATERIALI E METODI

7.1. Materiali e metodi per lo studio degli estratti metanolici e cloroformici

7.1.1. Metodo Cromatografico

HPLC

L'analisi quantitativa dei metaboliti è stata effettuata utilizzando pompe Waters 600 E corredate di autocampionatore Waters 717plus, detector PDA (Photodiode Array Detector Waters 486 Tunable Absorbance) supportati dal programma gestionale Millennium^{32®} Chromatography Manager (Waters).

Un aliquota del campione è stata iniettata in una colonna analitica Synergi Fusion-RP-80 (Phenomenex, 250 x 4,60 mm x 5µm) utilizzando come eluente due diverse miscele a seconda dei metaboliti ricercati:

- Erybraidina C, Bitucarpina A (pterocarpani) e Plicatina B sono state identificate lavorando in isocratica con una miscela di CH₃CN-H₂O in rapporto 7:3 ad un flusso di 1 mL/min
- Psoralene, angelicina e daidzeina sono state identificate lavorando in gradiente costituito da una miscela di CH₃CN (Solvente A) e H₂O (solvente B) ad un flusso di 1 mL/min. Il gradiente A:B era : 0 minuti 50:50; 20 minuti 70:30; 50 minuti 50:50.

In entrambi i casi la colonna è stata condizionata per 20 minuti con la miscela solvente adeguata a ciascuna analisi. La durata di ciascun analisi è stata di 60 minuti.

Gli spettri UV sono stati acquisiti tra 210 e 700 nm ed i cromatogrammi registrati a 260 nm. Tutte le procedure sono state eseguite a temperatura ambiente.

7.1.2. Spettrofotometria UV-vis

L'analisi colorimetrica dei composti naturali ricercati (clorofilla, carotenoidi, flavonoidi totali e polifenoli totali) e del potere antiossidante è stata condotta utilizzando lo spettrofotometro UV-vis. Per ciascun composto è stata letta l'assorbanza.

7.2. Materiale e metodi per lo studio dei composti volatili

7.2.1. Analisi Solid Phase Micro-Extraction (SPME)

Nella tecnica HS-SPME, detta analisi dello “spazio di testa”, si introduce nel gas cromatografo il campione costituito dalla miscela di composti emessi dalla pianta stessa e contenuti nell'aria che lo circonda. I volatili vengono captati ponendo il campione di pianta da analizzare all'interno di un contenitore chiuso per un tempo prefissato (al fine di saturare l'aria) al termine del quale si inserisce, attraverso una siringa, una fibra adsorbente che, saturata dell'aria del contenitore, viene poi inserita nella GC-MS per l'analisi.

La tecnica SPME viene utilizzata per l'estrazione e la concentrazione di composti organici da matrici liquide, semisolide e solide. Si basa sull'utilizzo di una fibra capillare di silice fusa (1 cm x 100 µm) rivestita da un sottile film polimerico (10-100 µm).

La fibra è contenuta all'interno dell'ago di una siringa simile a quella utilizzata per l'iniezione di campioni liquidi in un gas-cromatografo.

L'ago ha funzione di protezione della fibra durante le operazioni di foratura di setti (esempio introduzione nel contenitore di campionamento, iniezione nel gas-cromatografo), mentre la fibra viene estratta nella fase di adsorbimento e desorbimento (150-200°C).

I rivestimenti possono essere di vario tipo:

6 Polari: per l'estrazione di analiti polari organici (es. carbowax, poliacrilato)

7 Apolari: usati per l'estrazione di composti apolari (es. polidimetilsilossano=PDMS)

La procedura operativa della tecnica SPME dello spazio di testa, prevede che la fibra non si trovi a contatto con il campione, ma sia mantenuta per un tempo prefissato nello spazio di testa del campione, contenuto in un contenitore di vetro ermeticamente chiuso.

In questo modo gli analiti vengono adsorbiti dalla fase polimerica che riveste la fibra e successivamente desorbiti termicamente dall'iniettore del gas-cromatografo.

L'analisi SPME condotta sulle foglie di *B.bituminosa* è stata effettuata utilizzando l'apparecchio Supelco SPME con fibra rivestita da polidimetilsilossano (PDMS 100 µm). Terminato il campionamento la fibra è stata reintrodotta nell'ago e trasferita nell'iniettore GC-MS.

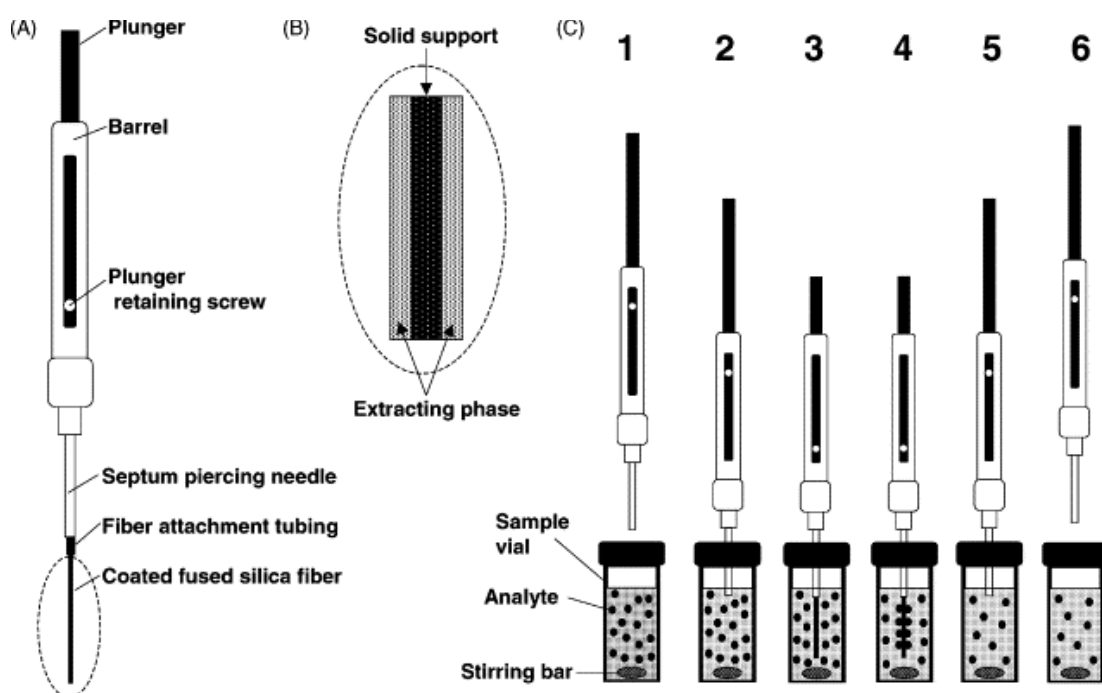


Figura 76 Illustrazione tecnica SPME

7.2.2. GC-MS

Le analisi GC/EIMS sono state condotte con un gas cromatografo VARIAN CP-3800 provvisto di colonna capillare (30 m x 0,25 mm; spessore di rivestimento 0,25 μm) e un detector di massa VARIAN SATURN 2000. Le condizioni analitiche sono state le seguenti: temperatura dell'iniettore e della transfer line rispettivamente di 220 e 240°C; temperatura del forno programmata da 60 a 240°C con aumento progressivo di 3°C/min; iniezione di 0,2 μl ; rapporto di split 1:30.

L'identificazione dei costituenti si è basata sul confronto dei loro tempi di ritenzione e dei loro indici di Kovats con quelli di campioni autentici e sulla corrispondenza con gli spettri di massa presenti nelle librerie commerciali del computer (NIST 98 e ADAMS) e in quella creata usando sostanze pure, costituenti di oli a composizione nota e dati di massa presenti in letteratura.



Figura 77 GC-MS

7.2.3. Calcolo degli Indici di Kovats

L'identificazione dei costituenti dello spazio di testa è stata basata sul confronto degli spettri di massa e degli indici di Kovats (KI) utilizzati come indici di ritenzione lineare (LRI) e degli spettri di massa con quelli riportati in letteratura. Il calcolo degli indici lineari di Kovats si basa sull'utilizzo di una miscela idrocarburica (C10-C28) iniettata precedentemente le iniezioni analitiche degli spazi di testa. Il tempo di ritenzione di un composto incognito viene riportato relativamente a quello di tali idrocarburi presenti nella miscela, utilizzando una scala logaritmica. Per definizione ad ogni idrocarburo è assegnato un indice pari a 100 volte il numero dei suoi atomi di carbonio; per esempio un idrocarburo con 18 atomi di carbonio ha un indice pari a 1800. L'indice di ritenzione I di un composto può essere così definito:

$$I = 100N + 100n \frac{\log t'R(A) - \log t'R(N)}{\log t'R(N+n) - \log t'R(N)}$$

Dove $t'R(N)$ e $t'R(N+n)$ sono i tempi di ritenzione convenzionali di due idrocarburi a catena lineare con un numero di carbonio pari a N e $(N+n)$ che sono rispettivamente eluiti prima e dopo il composto incognito A , che ha tempo di ritenzione $t'R(A)$.

8. PARTE SPERIMENTALE

8.1. Materiale vegetale

Le piante spontanee sono state prelevate all'Isola d'Elba (Livorno, Italia) nel periodo di Marzo (periodo vegetativo) e Maggio (periodo riproduttivo). I semi utilizzati appartengono alla collezione, depositata presso il Dipartimento di Farmacia, di piante spontanee raccolte all'Isola d'Elba in località Porto Azzurro e riconosciute dal dipartimento di Biologia (Orto Botanico dell'Università di Pisa).



Figura 78 Isola d'Elba

8.2. Sterilizzazione dei semi

Semi di *B.bituminosa* sono stati lavati con una soluzione acquosa di TWEEN-20 (20 %) e risciacquati tre volte in acqua. Successivamente, i semi sono stati immersi in EtOH al 70% per un minuto, risciacquati tre volte con acqua sterile quindi immersi in NaClO al 20% per due minuti e risciacquati per tre volte in acqua sterile ed asciugati con carta da filtro.

8.3. Semina

I semi sterilizzati sono stati disposti sul substrato Grodan¹ (Figura 79) e lasciati in cella climatica alla temperatura di 25°C ed esposti ad un fotoperiodo di 16 ore luce/ 8 ore buio per 25 giorni. Le piantine formate sono state trasferite nei vasi contenenti diversi terreni.



Figura 79 Semina su Grodan

8.4. Preparazione dei terreni

I substrati di crescita delle piante utilizzate per lo studio sono stati tre:

- 1 substrato di controllo non micorrizzato (NM)
- 2 terreno nativo prelevato direttamente a Porto Azzurro nell'Isola d'Elba (ELBA)
- 3 substrato inoculato con *Glomus intraradices* IMA5 (IMA5)

I tre substrati sono costituiti dai seguenti componenti:

1. Terreno sabbioso sterile
2. Inoculo batterico
3. Inoculo micorrizzato (non presente in NM)

¹ il grodan è il più comune e utilizzato substrato di coltivazione in idroponica al mondo. È un materiale inerte di natura minerale derivante dalla fusione di alcune rocce. Ha una struttura fibrosa con elevata porosità e una notevole ritenzione idrica. Per un corretto imbibimento si consiglia di immergerlo 24 ore prima del suo utilizzo

8.4.1. Preparazione del terreno sabbioso sterile

Il terreno sabbioso, raccolto a San Piero (Pisa, Italia) è stato setacciato per eliminare sporcizia e sassi; quindi è stato mescolato 1:1 con Terra green (calcinated clay, OILDRI, Chicago, IL, USA) ed infine sterilizzato in autoclave (tre cicli di 60 minuti a 121°C con intervallo di 24h tra i cicli).

8.4.1.1. Inoculo batterico

Per assicurare alla pianta una comune microflora batterica ai tre diversi trattamenti tutti i vasi hanno ricevuto un inoculo batterico costituito da un filtrato acquoso di suolo. Tale sospensione batterica assicura anche la presenza di rizobi, batteri simbiotici fondamentali per la fissazione dell'azoto nelle radici delle Fabaceae. La sospensione è stata preparata agitando, in 700 mL di acqua deionizzata, 100 g di terreno nativo e 100 g di inoculo grezzo di rizobio per circa un ora. La sospensione così preparata è stata infine filtrata con carta da filtro per eliminare le spore e le ife di funghi micorrizici arbuscolari.

8.4.2. Inoculo micorrizico

L'inoculo micorrizico del Substrato Inoculato (IMA5) consiste in terreno, spore, ife e frammenti di radici colonizzate dal fungo micorrizico *Glomus intraradices* (IMA5), proveniente dalla collezione di funghi micorrizici arbuscolari del Dipartimento di Scienze Agrarie, alimentari e agro-ambientali dell'Università di Pisa. Per il terreno nativo (ELBA), l'inoculo è composto dal suolo rizosferico raccolto intorno alle radici di *B.bituminosa* all'Isola d'Elba. Per il Substrato di controllo (NM) non è stato aggiunto alcun inoculo micorrizico.

Nei substrati dove previsto, in ogni vaso, 25 g di inoculo micorrizico sono stati aggiunti in piccoli pozzetti centrali dove poi sono state trasferite le piante di *B.bituminosa*.

8.5. Trasferimento delle piantine di *B. bituminosa*

Il trasferimento delle piantine germinate di *B.bituminosa* nei substrati è avvenuto dopo 25 giorni dalla semina in vasi precedentemente sterilizzati, di dimensioni 10x10x12 cm con capienza di un litro contenenti i diversi substrati precedentemente descritti. Ogni terreno è stato utilizzato per 20 piante e mantenute in camera di crescita per ulteriori 90 giorni con innaffiature regolari a base di acqua ed alternate con concimazioni a base di soluzione Hogland in rapporto di 1:2 per non sfavorire la crescita dei funghi micorrizici.

8.6. Rilievi morfologici

Dal trasferimento in vaso, chiamato T0 (tempo zero), fino al trasferimento definitivo in serra sono stati effettuati periodicamente rilievi morfologici per monitorare la crescita delle piantine di *B.bituminosa* ed avere così un quadro generale relativo alla crescita delle piante. E' stato misurato sia il numero e la lunghezza dei fusti che il numero e l'area delle foglie. Le stesse misurazioni sono state effettuate dopo 15, 30 e 45 giorni (T15, T30, T45). Per gli ultimi due rilievi, dopo 60 e 90 giorni (T60 e T 90), stati misurati solamente il numero e l'area delle foglie.

8.7. Prelievo delle piante e radici

Dopo una settimana dal trasferimento in serra è stato effettuato il primo prelievo ovvero quello delle piante nel loro stadio vegetativo. Per ogni terreno sono state prelevate quattro piante. Contemporaneamente sono state raccolte all' Isola d'Elba quattro piante spontanee in modo da poter confrontare i risultati tra piante spontanee e micorrizzate.

Le altre piante, per ogni tesi, sono state lasciate crescere in serra per altri 60 giorni fino alla fine della fioritura.

Per ciascun periodo e per ciascun tipo di substrato sono stati creati tre gruppi omogenei. I fiori, invece, sono stati raggruppati in un singolo gruppo per ogni tesi.

Le radici, alla fine del periodo riproduttivo, sono state dissotterrate, ripulite ed analizzate al microscopio per valutare l'effettiva micorrizzazione, poi sono state essiccate. Non sono state prelevate le radici delle piante spontanee elbane in quanto la loro raccolta sarebbe risultata molto difficoltosa a causa della profondità che raggiungono sotto terra.

Per ogni substrato le radici sono state raggruppate in tre gruppi omogenei.

8.8. Colorazione delle radici e determinazione della colonizzazione radicale dei funghi AM

Questa analisi è stata effettuata grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Scienze Agrarie, alimentari e agro-ambientali dell'Università di Pisa.

Una piccola porzione delle radici delle piante di *B. bituminosa* estratte dal suolo dopo la prima raccolta (periodo vegetativo) e lavate in acqua sono state chiarificate con KOH al 10% per 20 minuti a 80°C, lavate in acqua, e incubate in HCl al 2% per 5 minuti a temperatura ambiente. Infine sono state immerse in blu di Tripiano allo 0,05% in acido lattico e messe a 80°C per 7 minuti. Dopo l'eliminazione del colorante in eccesso mediante risciacqui con acqua, le radici, così colorate, sono state lasciate per tre giorni a 4°C quindi osservate al microscopio.

8.9. Analisi dei cataboliti

8.9.1. Determinazione di clorofilla a,b, totale e carotenoidi

La clorofilla a, la clorofilla b ed i carotenoidi sono stati determinati utilizzando il metodo colorimetrico Lichtenthaler (1987). Sono stati pesati circa 100 mg di foglie fresche di ogni campione sia del periodo vegetativo che di quello riproduttivo ed immerse in 5 mL di MeOH per 24 ore ad una temperatura di 4°C (camera fredda). Un'aliquota dell'estratto è

stata impiegata per la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a tre lunghezze d'onda diverse: 664 nm per la clorofilla a, 648 nm per la clorofilla b e 470 nm per i carotenoidi e calcolate la quantità di clorofilla come mg/peso fresco di materiale secondo le equazioni di Lichtenthaler 1987:

Clorofilla a (Ca) $\mu\text{g/mL}$: $13,36 \cdot A_{664,2} - 5,19 \cdot A_{648,6}$

Clorofilla b (Cb) $\mu\text{g/mL}$: $27,43 \cdot A_{648,6} - 8,12 \cdot A_{664,2}$

Clorofilla totale (Ca+Cb) $\mu\text{g/mL}$: $5,24 \cdot A_{664,2} + 22,24 \cdot A_{648,6}$

Carotenoidi : $1000 \cdot A_{470} - 2,14 \cdot Ca - 97,64 \cdot Cb / 209$

8.9.2. Determinazione e quantizzazione dei Flavonoidi totali, Polifenoli totali e del Potere antiossidante

Tutte e tre le analisi sono state effettuate su estratti metanolici di foglie e radici.

8.9.2.1. Estrazione metanolica di foglie e radici

Dai campioni sono stati pesati circa 200 mg di foglie e circa 100 mg di radici essiccate, messi in un mortaio raffreddato in ghiaccio e sfarinati con l'aiuto di un pestello.

Successivamente sono stati aggiunti 2 mL di metanolo al 70% e omogenizzati per facilitare l'estrazione. Il tutto è stato trasferito in eppendorf e lasciato in ghiaccio per circa 30 minuti. I composti sono stati centrifugati a 14000 giri al minuto per 10 minuti a temperatura ambiente. È stato infine prelevato il sovrantante. La procedura è stata ripetuta per ogni campione sia appartenente al periodo vegetativo che al riproduttivo.

8.9.2.2. Determinazione e quantizzazione dei Flavonoidi totali

È stato utilizzato il metodo colorimetrico di Kim et al.(2003).

Il metodo dell'alluminio cloruro permette di determinare il contenuto di flavonoidi totali, separando il loro contributo da quello dei polifenoli. Il principio di base si fonda sul fatto che l'alluminio cloruro è in grado di formare complessi con i flavonoidi che posseggono gruppi orto-diidrossi, peri-idrossi-osso e orto-idrossi-osso (Figura 80).

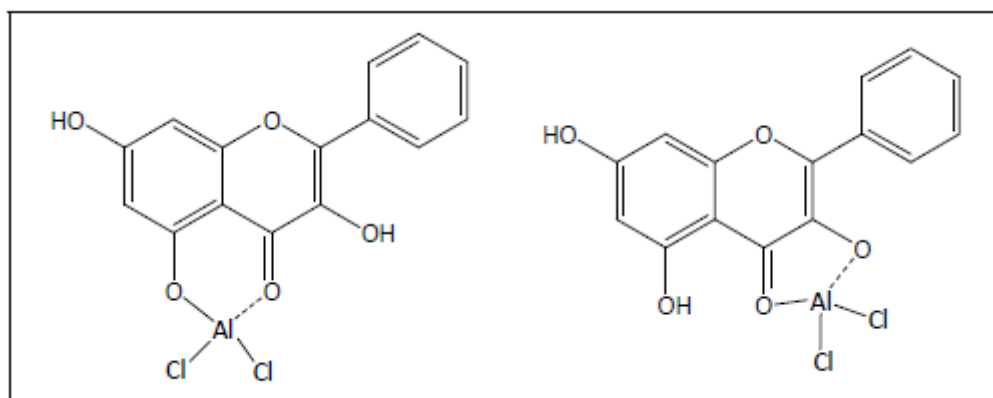


Figura 80 Complesso flavonoide alluminio cloruro

Dagli estratti sono stati prelevati 25 µL di campione ai quali sono stati aggiunti 225 µL di acqua distillata, per portare a volume e 75 µL di Nitrito di sodio (NaNO₂) al 5%. Trascorsi i 5 minuti di incubazione sono stati aggiunti 75 µL di una soluzione al 10% di Tricloruro di alluminio (AlCl₃). Trascorsi i 5 minuti d'incubazione sono stati aggiunti 500 µL di Idrossido di sodio (NaOH) 1M. Dopo 15 minuti è stato possibile leggere l'assorbanza allo spettrofotometro UV-vis ad una lunghezza d'onda di 415 nm del complesso flavonoide-alluminio.

Per la determinazione quantitativa è stata fatta una curva di taratura utilizzando come standard la quercetina (1:1) p/v solubilizzata in Metanolo assoluto. La rispettiva equazione di regressione lineare ed il coefficiente sono riportati in tabella 1 e 2.

Conoscendo il volume dell'estratto ed il peso del campione vegetale è stato possibile ricavare i mg/g di peso fresco di flavonoidi.

8.9.2.3. Determinazione e quantizzazione dei Polifenoli totali

Il totale dei polifenoli presenti nei campioni di bituminosa è stato determinato impiegando il metodo Folin-Ciocalteau (Singleton and Rossi, 1965).

Questo metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamata reattivo di Folin, costituita da acido fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) che, riducendosi, forma una miscela di ossidi di tungsteno e molibdeno (W_8O_{23} e Mo_8O_{23}) colorata di azzurro che mostrano un massimo di assorbimento a 750 nm.

20 μL di estratto metanolico sono stati prelevati e portati a volume di 50 μL con l'aggiunta di acqua distillata; sono stati aggiunti 500 μL di Folin-Ciocalteau puro e dopo averli incubati per 5 minuti a temperatura ambiente sono stati addizionati 450 μL di Carbonato di sodio (Na_2CO_3) al 7,5% mantenuto per 2 ore sotto blanda agitazione per favorire la liberazione di anidride carbonica. È stata effettuata la lettura dell'assorbanza dei campioni allo spettrofotometro UV-vis ad una lunghezza d'onda di 765 nm.

Per la calibrazione è stata effettuata una retta di taratura utilizzando come standard acido clorogenico (5mg/ml) con metanolo al 50%. La rispettiva equazione di regressione lineare ed il coefficiente di correlazione sono riportati in tabella (Tabella 1-2)

8.9.2.4. Determinazione del Potere antiossidante

Il potere antiossidante di foglie e radici è stato misurato utilizzando il metodo FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power) (Szöilősi et al., 2002)

Il saggio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) misura l'abilità degli antiossidanti a ridurre il complesso di ferro (III) con 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ al complesso ridotto di ferro (II) $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Figura 81), intensamente colorato di blu, in ambiente acido. Il potere riducente viene calcolato monitorando l'aumento di assorbanza a 593 nm, confrontandola con quella di una soluzione standard antiossidante (ad esempio acido ascorbico).

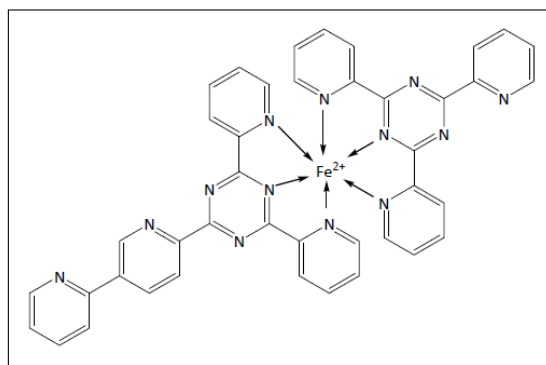


Figura 81 Complesso $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$

La soluzione FRAP si ottiene unendo tre soluzioni:

- buffer acetato 30 mM
- soluzione TPTZ 10 mM (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) sciolto in HCl 40 mM
- soluzione $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 20 mM sciolto in acqua

30 mL di soluzione FRAP si ottengono unendo 25 mL di buffer acetato, 2,5 mL di TPTZ e 2,5 mL di FeCl_3 .

Ad un aliquota dell'estratto metanolico del campione vegetale (20 μL) si aggiunge 900 μL di soluzione FRAP. Dopo aver lasciato incubare per 4 minuti viene letta l'assorbanza allo spettrofotometro a 593 nm.

Per la retta di taratura, come standard, è stato utilizzato FeSO_4 1mM. La rispettiva equazione di regressione lineare ed il coefficiente di correlazione sono riportati in tabella (Tabella 1-2)

| composto ricercato | standard utilizzato | Range di concentrazione ($\mu\text{L} = \mu\text{g}$) | Equazione di regressione |
|-------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Flavonoidi totali | Quercetina | 0-150 | $y=0,04x$ ($r=0,999$) |
| Polifenoli totali | Acido Clorogenico | 0-50 | $y=0,049x$ ($r=0,994$) |
| Potere antiossidante | FeSO_4 | 0-80 | $y=0,006x$ ($r=0,999$) |

Tabella 1 Equazione di regressione lineare e rispettivi coefficienti di correlazione periodo vegetativo

| composto ricercato | standard utilizzato | Range di concentrazione (μL = μg) | Equazione di regressione |
|----------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Flavonoidi totali | Quercetina | 0-150 | $y=0,046x$ ($r=0,999$) |
| Polifenoli totali | Acido Clorogenico | 0-50 | $y=0,021x$ ($r=0,994$) |
| Potere antiossidante | FeSO_4 | 0-80 | $y=0,006x$ ($r=0,999$) |

Tabella 2 Equazione di regressione lineare e rispettivi coefficienti di correlazione periodo riproduttivo

8.9.3. Ricerca e determinazione di pterocarpani, isoflavonoidi, furanocumarine e plicatina B

La ricerca e la determinazione di questi metaboliti secondari è stata effettuata su estratti cloroformici di foglie, fiori e radici di *B. bituminosa*

8.9.3.1. Macerazione ed Estrazione cloroformica del materiale vegetale

Ciascun campione è stato sistemato in beute da circa 500 mL a cui sono stati aggiunti circa 250 mL di cloroformio e lasciati in agitazione per 7 giorni quindi il cloroformio è stato raccolto e sostituito con altri 250 mL per altri 7 giorni. Gli estratti filtrati con carta da filtro sono stati evaporati a pressione ridotta mediante evaporatore rotante ad una temperatura di 40°C. I residui sono stati pesati determinandone la resa (Tabella 3-4). Gli estratti secchi sono stati nuovamente solubilizzati in cloroformio, stoccati in vials e riposti ad una temperatura di -20°C.

8.9.3.2. Preparazione di soluzioni a concentrazione nota degli estratti per analisi HPLC

Per ogni estratto cloroformico è stata prelevata un aliquota corrispondente a circa 10-20 mg di estratto ed è stata di nuovo portata a secco a pressione ridotta con evaporatore rotante e solubilizzata in 5 o 10 mL di metanolo ottenendo delle soluzioni a concentrazione nota secondo lo schema riportato nelle tabelle 5 e 6. Le soluzioni sono state filtrate con filtri in PTFE (0,45 μ M- 25mm).

| | | FOGLIE PESO FRESCO (g) | | PESO TOTALE ESTRATTO (mg) |
|------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------|--|--------------------------------------|
| | | | | |
| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | NM 4 | 0,014 | | 159 |
| | NM 10 | 0,009 | | 114 |
| | NM 14 | 13,686 | | 187 |
| | IMA 5/7 | 6,733 | | 90 |
| | IMA 5/11 | 8,511 | | 95 |
| | IMA 5/20 | 7,069 | | 99 |
| | ELBA 4 | 10,231 | | 111 |
| | ELBA 5 | 13,633 | | 91 |
| | ELBA 19 | 9,564 | | 155 |
| | PA 4 | 7,596 | | 145 |
| | PA 5 | 7,533 | | 119 |
| | | | | |
| FOGLIE E FIORI PERIODO RIPRODUTTIVO | NM 1 | 20,46 | | 662 |
| | NM 2 | 16,67 | | 660 |
| | NM 3 | 21,7 | | 1279 |
| | NM fiori | 13,772 | | 611 |
| | ELBA 1 | 20,35 | | 948 |
| | ELBA 2 | 20,96 | | 846 |
| | ELBA 3 | 20,727 | | 1350 |
| | ELBA fiori | 28,567 | | 835 |
| | IMA 1 | 17,28 | | 792 |
| | IMA 2 | 15,51 | | 697 |
| | IMA 3 | 10,72 | | 380 |
| | IMA fiori | 14,987 | | 299 |
| | PA 1 | 24,477 | | 308 |
| | PA 2 | 23,636 | | 705 |
| | PA 3 | 75,95 | | 612 |
| | PA fiori | 22,834 | | 429 |

Tabella 3 Peso totale estratto cloroformico di foglie e fiori (mg)

| | CAMPIONE | RADICI PESO SECCO (g) | | PESO TOTALE ESTRATTO(mg) |
|---------------|-----------------|--------------------------------------|--|-------------------------------------|
| | | | | |
| RADICI | NM1 | 11,27 | | 79 |
| | NM2 | 12,71 | | 240 |
| | NM3 | 10,54 | | 103 |
| | ELBA1 | 10,07 | | 72 |
| | ELBA2 | 14,4 | | 104 |
| | ELBA3 | 11,35 | | 199 |
| | IMA5/1 | 10,24 | | 41 |
| | IMA5/2 | 9,21 | | 25 |
| | IMA5/3 | 10,25 | | 67 |

Tabella 4 Peso totale estratto cloroformico radici

| | CAMPIONE | mg PRELEVATI | ml MeOH | ppm |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|------------|
| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | NM 4 | 19.7 | 10 | 1970 |
| | NM 10 | 23.8 | 10 | 2380 |
| | NM 14 | 18.4 | 10 | 1840 |
| | IMA 5/7 | 15.2 | 10 | 1520 |
| | IMA 5/11 | 11.2 | 5 | 2240 |
| | IMA 5/20 | 17.9 | 10 | 1790 |
| | ELBA 4 | 17.9 | 10 | 1790 |
| | ELBA 5 | 12.3 | 5 | 2460 |
| | ELBA 19 | 11.9 | 5 | 2380 |
| | PA 4 | 10.2 | 10 | 1020 |
| | PA 5 | 16.4 | 10 | 1640 |
| FOGLIE E FIORI PERIODO RIPRODUTTIVO | NM 1 | 9.5 | 5 | 1900 |
| | NM 2 | 12.9 | 5 | 2580 |
| | NM 3 | 13.5 | 5 | 2700 |
| | NM fiori | 13.2 | 5 | 2640 |
| | ELBA 1 | 26.3 | 10 | 2630 |
| | ELBA 2 | 20.4 | 10 | 2040 |
| | ELBA 3 | 14.6 | 5 | 2920 |
| | ELBA fiori | 17.4 | 10 | 1740 |
| | IMA 1 | 21.1 | 10 | 2110 |
| | IMA 2 | 21.5 | 10 | 2150 |
| | IMA 3 | 12.8 | 5 | 2560 |
| | IMA fiori | 21.2 | 10 | 2120 |
| | PA 1 | 15.6 | 10 | 1560 |
| | PA 2 | 16.6 | 10 | 1660 |
| | PA 3 | 27.0 | 10 | 2700 |
| | PA fiori | 20.6 | 10 | 2060 |

Tabella 5 mg di estratto cloroformico di foglie e fiori utilizzati per ottenere soluzioni a concentrazione nota

| | CAMPIONE | mg PRELEVATI | mlMeOH | ppm |
|--------|-----------------|-------------------------|---------------|------------|
| RADICI | NM1 | 23,6 | 20 | 1180 |
| | NM2 | 14,9 | 10 | 1490 |
| | NM3 | 22,1 | 20 | 1105 |
| | ELBA1 | 12,4 | 10 | 1240 |
| | ELBA2 | 15,5 | 10 | 1550 |
| | ELBA3 | 11,5 | 10 | 1150 |
| | IMA5/1 | 22,3 | 20 | 1115 |
| | IMA5/2 | 18,4 | 10 | 1840 |
| | IMA5/3 | 21 | 20 | 1050 |

Tabella 6 mg di estratti cloroformico di radici per ottenere soluzioni metanoliche a concentrazione nota

8.9.3.3. Determinazione degli Pterocarpani ed Plicatina B

Per la determinazione di Plicatina B, bitucarpina A ed eribraidina C sono state utilizzate le stesse condizioni già note per la loro ricerca in foglie e fiori di bituminosa (Pistelli et al., 2003). 5 o 20 µL di ciascun campione, disciolto in metanolo, sono stati iniettati in una colonna analitica Synergi Fusion-RP-80 (Phenomenex, 250 x 4,60 mm x 5µm) utilizzando come eluente una miscela di CH₃CN-H₂O in rapporto 7:3 ad un flusso di 1mL/min. Per determinare quantitativamente i metaboliti secondari è stata costruita una retta di taratura ottenuta utilizzando diverse aliquote di standard puri solubilizzati in MeOH in modo tale da creare un range all'interno del quale far rientrare tutte le concentrazioni dei campioni di bituminosa analizzati. Le rispettive rette, le rispettive equazioni ed il coefficiente di correlazione per gli standard sono riportati in tabella (Tabella 7).

Ogni campione è stato analizzato in triplicato. La bitucarpina A ha un tempo di ritenzione di circa 18 minuti ed assorbe a 284 nm ; la Plicatina B ha un tempo di ritenzione di 6,7 minuti ed assorbe a 232-315 nm; l'eribraidina C, invece, ha un tempo di ritenzione di 10,7 minuti ed assorbe a 286 nm (Tabella 8).

8.9.3.4. Determinazione di furanocumarine e daidzeina o genisteina

Per la determinazione di psoralene, angelicina e genisteina sono state adottate altre condizioni. 5 o 20 µL di campione sono stati iniettati in colonna lavorando in gradiente , descritto in precedenza, ad un flusso di 1mL/min . La curva di taratura è stata ottenuta utilizzando standard puri solubilizzati anch'essi in MeOH e poi filtrati. Ogni curva è stata costruita utilizzando diverse aliquote di standard. Le rispettive equazioni ed il coefficiente di correlazione per gli standard sono riportati in tabella (Tabella 7). Un' aliquota di 20 µL per ogni campione è stata analizzata. Lo psoralene ha un tempo di ritenzione di 8 minuti ed assorbe a 244 e 291 nm; angelicina ha un tempo di ritenzione di 8,5 minuti ed assorbe a 246 e 298 nm, mentre la genisteina ha un tempo di ritenzione di 6.2 minuti ed assorbe a 259,5 nm (Tabella 8).

| Campione | Range di concentrazione (ppm) | Equazione di regressione |
|---------------|---------------------------------|--------------------------|
| Plicatina B | 0-3000 | $y=10106x$ (r=0,992) |
| Erybraidina C | 0-4000 | $y = 2945x$ (r=0,981) |
| Bitucarpina A | 0-4000 | $y = 30045x$ (r=0,994) |
| Psoralene | 0-3000 | $y = 15798x$ (r=0,987) |
| Angelicina | 0-3000 | $y = 27463x$ (r=0,994) |
| Genisteina | 0-3200 | $y = 23348x$ (r=0,999) |

Tabella 7 Equazioni e coefficienti di correlazione per la determinazione dei metaboliti secondari in *B. bituminosa*

| Campione | Rt (min) | λ_{max} |
|---------------|------------|-----------------|
| Plicatina B | 6.7 | 232-315 |
| Erybraidina C | 10.7 | 287 |
| Bitucarpina A | 18 | 284 |
| Psoralene | 8 | 244-291 |
| Angelicina | 8.5 | 246-298 |
| Genisteina | 6.2 | 259,5 |

Tabella 8 Tempi di ritenzione ed assorbanza dei metaboliti ricercati in *B.bituminosa*

8.10. Frazione volatile

8.10.1. Determinazione dei composti volatili nelle foglie di *B. bituminosa*

L'analisi SPME è stata condotta utilizzando la siringa Supelco SPME con fibra costituita da polidimetilsilossano (PDMS 100 μm). E' stato pesato circa 1 mg di foglie per ciascun trattamento, inserito in beute da 100 mL e lasciate equilibrare per 20 minuti. La fibra, poi, è stata esposta ai volatili per 15 minuti a temperatura ambiente quindi inserita nella GC-MS per l'analisi.

9. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dalle piante elicitate con *Glomus intraradices* (IMA5) sono stati confrontati sia con quelli ottenuti dalle piante elicitate con funghi micorrizici presenti nel terreno raccolto intorno alle piante di bituminosa all'Isola d'Elba (ELBA), sia con il controllo non micorrizzato (NM). I dati infine ottenuti dalle piante coltivate in vaso sono stati infine confrontati con quelli delle piante spontanee (PA) delle piante raccolte all'Isola d'Elba.

9.1. Colonizzazione radicale dei funghi AM

Dall'analisi effettuata sulle radici è stato osservato che la colonizzazione radicale è presente nelle piante inoculate, mentre è assente nelle non micorrizzate. Dai dati si evince che *G.intraradices* (IMA5) promuove una maggiore colonizzazione rispetto ad ELBA (Figura 82).

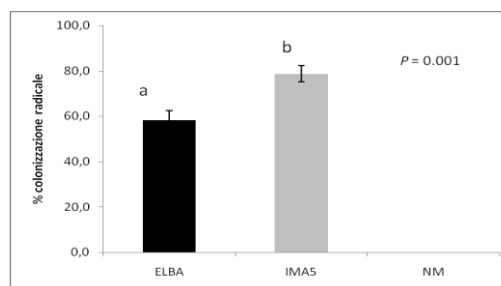


Figura 82 Percentuale della colonizzazione radicale

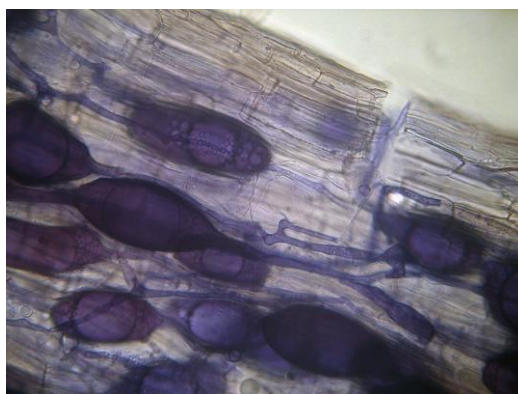


Figura 83 Immagine al microscopio della micorrizzazione radicale

9.2. Rilievi morfologici

9.2.1. Numero ed area delle foglie

Dai rilievi morfologici effettuati si osserva che il numero delle foglie in NM (9,25) è maggiore rispetto ad IMA5 (8,4) ed ELBA (7,65) al momento del trasferimento in vaso (T0 tempo zero), mentre raddoppia passando dal T0 al 30° giorno (NM 18,75; ELBA 17,95; IMA5 21,15), dal 30° giorno al 45° (NM 29,15; ELBA 32,05; IMA5 68,90) e dal 45° giorno al 90° (NM 73,50; ELBA 68,90; IMA5 76,26) (Tabella 9). Tra i tre trattamenti il migliore è risultato IMA5 confermando così i dati presenti in letteratura dove *Glomus intraradices* stimola l'aumento della biomassa di *Cynara cardunculus* cresciuta in vaso (Ceccarelli et al., 2010).

L'area delle foglie è maggiore in NM (9,83 mm²) rispetto ad IMA5 (8,1 mm²) ed ELBA (7,05 mm²) al momento del trasferimento in vaso (T0), raddoppia per tutte e tre passando dal T0 (NM 9,83 mm²; ELBA 7,05 mm²; IMA5 8,1 mm²) al T30 (NM 19,08 mm²; ELBA 16,22 mm² IMA5 22,01 mm²) e triplica dal 30° giorno al 45° (NM 43,57 mm²; ELBA 68,98 mm²; IMA5 68,98 mm²) (Tabelle 9-10).

Al 60° giorno si nota che IMA5 è l'inoculo che stimola un maggior accrescimento della superficie fogliare (118,25 mm²) rispetto ad ELBA (103,93 mm²) ed NM (67,44 mm²), mentre passando dal 60° al 90° giorno le micorrize presenti nel terreno elbano stimolano maggiormente le piante incrementando l'area delle foglie (149,58 mm²) rispetto ad IMA5(127,04 mm²) e NM (104,09 mm²) (Tabelle 9-10).

| N Foglie | T0 | T15 | T30 | T45 | T60 | T90 |
|----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NM | 9,25 | 7,74 | 18,75 | 29,15 | 46,00 | 73,50 |
| IMA5 | 8,4 | 13,60 | 21,15 | 37,15 | 56,95 | 76,26 |
| ELBA | 7,65 | 11,25 | 17,95 | 32,05 | 50,21 | 68,90 |

Tabella 9 Variazione del numero di foglie in relazione ai tre trattamenti utilizzati

| Area foglie | T0 | T15 | T30 | T45 | T60 | T90 |
|-------------|-----------|------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| NM | 9,83±3,32 | 11,42±3,73 | 19,86±4,64 | 43,57±22,88 | 67,44±33,54 | 104,19±51,07 |
| IMA5 | 8,1±1,87 | 13,55±3,41 | 22,01±6,40 | 92,18±43,65 | 118,25±39,14 | 127,04±46,01 |
| ELBA | 7,05±2,63 | 11,04±2,97 | 16,22±4,20 | 68,98±38,27 | 103,93±42,26 | 149,58±71,21 |

Tabella 10 Variazione area foglie in base ai tre trattamenti utilizzati. Risultati medie di tre replicati ± SD

9.2.2. Numero e lunghezza degli steli

Il numero degli steli è simile per tutte le piante al momento del trasferimento in vaso e raddoppia in un mese passando da T0 (NM 4,32; IMA5 4,32; ELBA 3,95) a T30 (NM 9; IMA5 9,25; ELBA 8,50). Dal 30° giorno al 45° il numero degli steli aumenta invece del 25% (NM 12,65; IMA5 11,6; ELBA 14,65) (Tabella 11).

| Numero steli | T0 | T15 | T30 | T45 |
|--------------|-------|------|------|-------|
| NM | 4,32; | 5,74 | 9,00 | 12,65 |
| IMA5 | 4,32 | 6,25 | 9,25 | 11,60 |
| ELBA | 3,95 | 6,10 | 8,50 | 14,65 |

Tabella 11 Variazione numero di steli in relazione ai tre trattamenti utilizzati

La lunghezza degli steli è simile per tutte le piante al momento del trasferimento in vaso (T0 (NM 2,43 cm; IMA5 2,65 cm; ELBA 2,68cm) e raddoppia dopo 45 giorni (NM 4,08 cm; IMA5 5,55 cm; ELBA 5,85 cm) (Tabella 12).

| Lunghezza steli | T0 | T15 | T30 | T45 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| NM | 2,43±0,81 | 3,14±0,98 | 3,59±1,63 | 4,08±1,14 |
| IMA5 | 2,65±0,86 | 3,25±1,52 | 4,37±2,75 | 5,55±2,75 |
| ELBA | 2,68±0,96 | 3,22±1,35 | 4,18±2,32 | 5,85±3,99 |

Tabella 12 Variazione della lunghezza degli steli in relazione ai tre trattamenti utilizzati. Risultati medie di tre replicati ± SD

Dai risultati ottenuti e riportati in tabella possiamo affermare che l'inoculo IMA5 influenza sia il numero degli steli che la loro lunghezza fino al 30° giorno. A partire da questo momento le micorrize presenti nel terreno elbano promuovono l'aumento sia della lunghezza che del numero degli steli

[Digitare il testo]

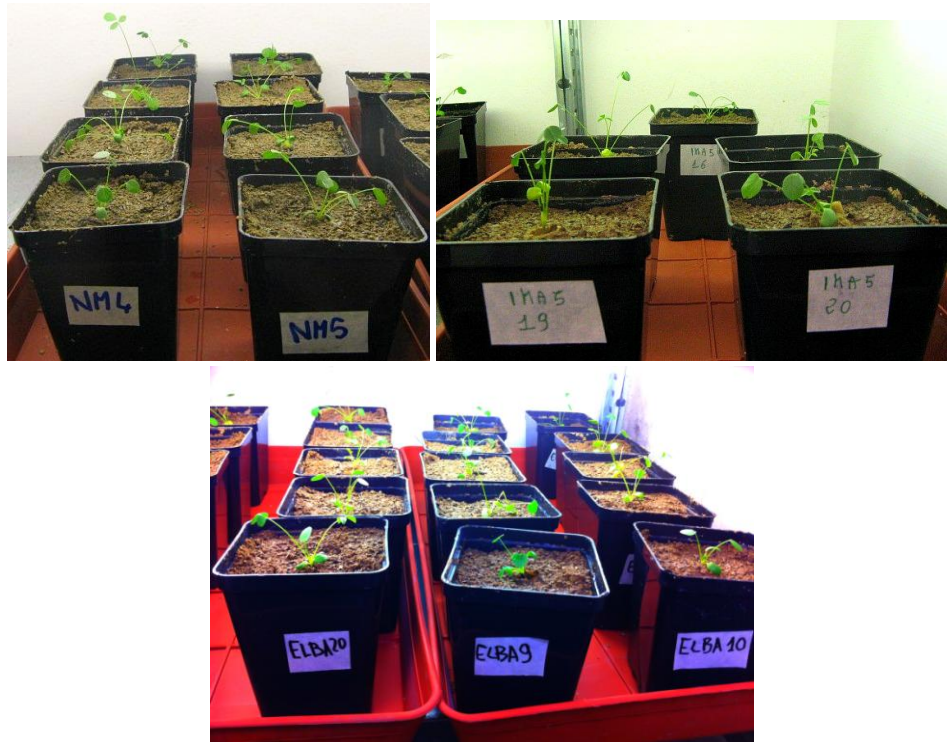


Figura 84 T0 Trasferimento in vaso (NM- IMA5-ELBA) di piantine di *B.bituminosa*



Figura 85 T45 *B.bituminosa* al 45° giorno

[Digitare il testo]



Figura 86 T60 *B.bituminosa* 60° giorno

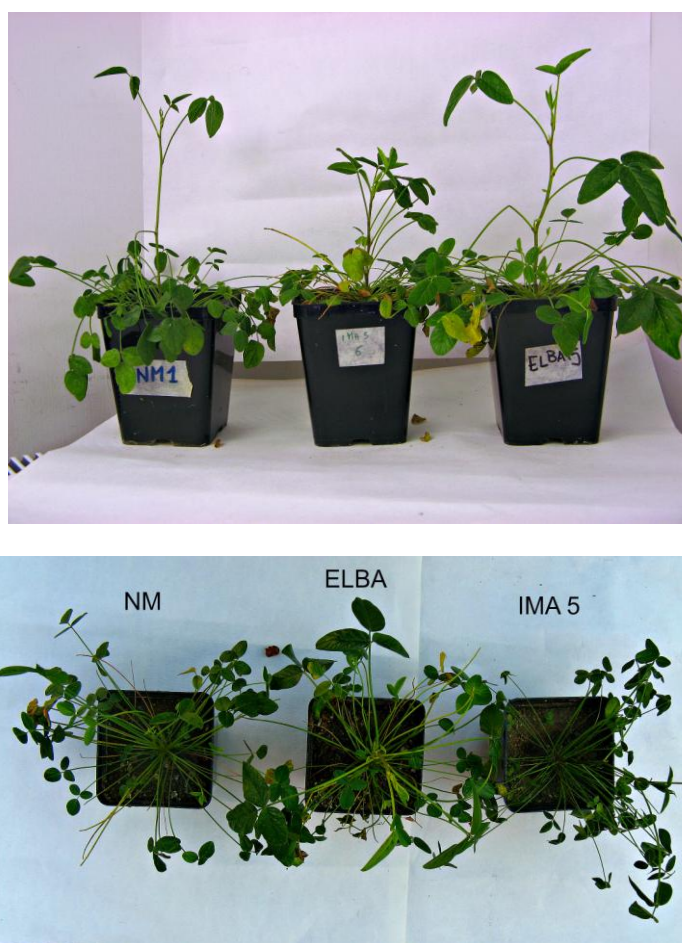


Figura 87 T90 *B.bituminosa* 90° giorno

[Digitare il testo]



Figura 88 T90 *B.bituminosa* 90° giorno trasferimento in serra

9.3. Determinazione di clorofilla e carotenoidi

I dati riportati in tabella mostrano che, nel periodo vegetativo, la clorofilla a è maggiore in NM (0,98 mg/g FW) rispetto alle piante micorrizate (ELBA 0,75 mg/g FW; IMA5 0,87 mg/g FW); la clorofilla b è maggiore in ELBA (0,98 mg/g FW) mentre risulta più bassa in NM (0,35 mg/g FW) ed IMA5 (0,33 mg/g FW); la clorofilla totale risulta quindi maggiore in ELBA (1,64 mg/g FW) rispetto a NM (1,33 mg/g FW) ed IMA5 (1,20 mg/g FW). Da questi risultati si calcola il rapporto tra clorofilla a/b che è basso in ELBA (0,84), a conferma dell'alto valore di clorofilla b, mentre è maggiore in NM (2,79) ed in IMA5 (2,63). Il valore di ELBA dimostra una sofferenza della pianta poiché una pianta sana ha generalmente un rapporto clorofilla a/b compreso tra 2,5 e 3 (Tabella 12).

I carotenoidi sono maggiormente prodotti nella pianta ELBA (120,62 mg/g FW), mentre diminuiscono in NM (98,07 mg/g FW) ed ancora di più in IMA5 (85,52 mg/g FW) (Tabella 13).

| CAMPIONE | CHL a mg/g FW | CHLb mg/g FW | CHL tot mg/g FW | CHL a/b mg/g FW | CAROTENOIDI mg/g FW |
|----------|---------------------|-----------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| NM | 0,98 | 0,35 | 1,33 | 2,79 | 98,07 |
| ELBA | 0,75 | 0,89 | 1,64 | 0,84 | 120,62 |
| IMA 5 | 0,87 | 0,33 | 1,20 | 2,63 | 85,52 |

Tabella 13 PERIODO VEGETATIVO Determinazione di clorofilla e carotenoidi in relazione ai tre trattamenti utilizzati.

Nel periodo riproduttivo la clorofilla a risulta essere uguale in tutti e tre i trattamenti (NM 0,89; ELBA 0,83; IMA5 0,82 mg/g FW); la clorofilla b, invece, è maggiore in IMA5 (1,81 mg/g FW), mentre diminuisce in ELBA (1,12 mg/g FW) e si dimezza in NM (0,83 mg/g FW); la clorofilla totale è maggiore in IMA5 (2,70 mg/g FW) e diminuisce in ELBA (1,95 mg/g FW) ed NM (1,72 mg/g FW). Il rapporto clorofilla a/b risulta basso IMA5 (0,44 mg/g FW), indice di sofferenza della pianta, mentre aumenta in ELBA (1,06 mg/g FW) ed NM (1,67 mg/g FW). I carotenoidi sono maggiormente accumulati in IMA5 (123,6 mg/g FW) mentre in ELBA (105,85 mg/g FW) ed in NM (88,54 mg/g FW) la loro concentrazione diminuisce (Tabella 14).

Dai risultati in tabella si evince che la micorrizzazione con *G. intraradices* promuove solamente la produzione di clorofilla b e carotenoidi nel periodo riproduttivo non confermando i dati presenti in letteratura (Ceccarelli et al., 2010), dove *G. intraradices* promuove la produzione dei pigmenti nelle piante di carciofo coltivate in vaso, mentre le micorrize presenti in ELBA promuovono la produzione della clorofilla b e dei carotenoidi nel periodo vegetativo.

| CAMPIONE | CHL a mg/g FW | CHLb mg/g FW | CHL tot mg/g FW | CHL a/b mg/g FW | CAROTENOIDI mg/g FW |
|----------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| NM | 0,89 ± 0,15 | 0,83 ± 0,52 a | 1,72 ± 0,61 a | 1,67 ± 1,23 | 88,54 ± 18,63 a |
| ELBA | 0,83 ± 0,11 | 1,12 ± 0,57 ab | 1,95 ± 0,52 ab | 1,06 ± 0,89 | 105,85 ± 14,84 ab |
| IMA 5 | 0,82 ± 0,10 | 1,81 ± 0,21 b* | 2,70 ± 0,21 b | 0,44 ± 0,08 | 123,60 ± 8,64 b |

Tabella 14 PERIODO RIPRODUTTIVO Determinazione clorofilla e carotenoidi in relazione ai tre trattamenti utilizzati. Risultati medie tre replicati ± SD

La significatività dei dati è stata valutata tramite test statistico ANOVA ($P < 0,05$)

9.4. Determinazione dei Flavonoidi totali

Nel periodo vegetativo il contenuto più alto di flavonoidi è stato ottenuto dalle piante spontanee PA (6,23 mg/g FW). Tra le piante coltivate in vaso NM mostra un maggior accumulo di metaboliti (4,06 mg/g FW) rispetto ad ELBA (3,54 mg/g FW) ed IMA5 (3,28 mg/g FW) (Tabella 15). Questi dati evidenziano che la micorrizzazione in vaso non stimola una maggiore produzione dei flavonoidi rispetto al controllo NM ed alle piante spontanee.

| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | FLAVONOIDI TOTALI mg/g FW |
|------------------------------|----------|------------------------------|
| | NM | 4,06 ± 0,20 |
| | ELBA | 3,54 ± 0,98 |
| | IMA 5 | 3,28 ± 0,53 |
| | PA | 6,23 ± 0,36 |

Tabella 15 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO contenuto di flavonoidi totali in estratto metanolico

Risultati medie di tre replicati ± SD.

Nel periodo riproduttivo le piante spontanee (PA) mostrano una maggiore produzione dei metaboliti (8,57 mg/g FW) rispetto a quelle coltivate in vaso. Tra queste ELBA mostra un maggior accumulo dei metaboliti (4,75 mg/g FW) rispetto ad NM (4,22 mg/g FW) ed IMA5 (4,09 mg/g FW) dove la concentrazione dei flavonoidi si dimezza (Tabella 16).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | FLAVONOIDI TOTALI mg/g FW |
|--------------------------------|----------|------------------------------|
| | NM | 4,22±0,11 |
| | ELBA | 4,75±1,01 |
| | IMA5 | 4,09±0,47 |
| | PA | 8,57±1,78 |

Tabella 16 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO contenuti flavonoidi totali in estratto metanolico
Risultati medie di tre replicati ±SD.

Dai risultati ottenuti è emerso che l'accumulo dei Flavonoidi nelle foglie aumenta passando dal periodo vegetativo a quello riproduttivo.

Nelle radici secche il contenuto dei metaboliti è maggiore nel controllo (NM) (2,46 mg/g DW), mentre diminuisce in ELBA (1,62 mg/g DW) ed IMA5 (1,26 mg/g DW) (Tabella 17).

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | FLAVONOIDI TOTALI mg/g DW |
|------------------------|----------|------------------------------|
| | NM | 2,59±0,34 |
| | ELBA | 1,68±0,34 |
| | IMA 5 | 1,34±0,37 |

Tabella 17 Contenuto di flavonoidi totali in radici di B.bituminosa fine periodo
Risultati medie di tre replicati ±SD.

9.5. Determinazione dei polifenoli totali

Dai risultati riportati in tabella si evince che nel periodo vegetativo l'accumulo dei polifenoli nelle foglie è maggiore in NM (3,28 mg/g FW). Il valore ottenuto è simile ad IMA5 (3,25 mg/g FW). In ELBA la produzione dei metaboliti diminuisce (2,57 mg/g FW) e risulta simile a quella delle piante spontanee (2,62 mg/g FW) (Tabella 18).

| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | POLIFENOLI TOT mg/g FW |
|---------------------------|----------|------------------------|
| | NM | 3,28 ±0,53 |
| | ELBA | 2,57±0,27 |
| | IMA 5 | 3,25±0,38 |
| | PA | 2,62±0,06 |

Tabella 18 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO contenuto di polifenoli totali in estratto metanolico di *B.bituminosa*
Risultati medie di tre replicati ±SD.

Questi dati non confermano quelli già presenti in letteratura (Ceccarelli et al 2010) dove l'inoculo *Glomus intraradices* (IMA5) promuove, nelle piante di carciofo coltivate in vaso, una maggiore produzione dei polifenoli rispetto alle piante non micorrizate.

Nel periodo riproduttivo le piante spontanee mostrano una maggior concentrazione di polifenoli (17,87 mg/g FW) rispetto alle piante coltivate in vaso. Tra queste si osserva un maggior accumulo in ELBA (9,80 mg/g FW) rispetto agli altri due trattamenti (NM 8,58 mg/g FW; IMA5 9,03 mg/g FW) (Tabella 19).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | POLIFENOLI TOT mg/g FW |
|-----------------------------|----------|------------------------|
| | NM | 8,58±0,93 |
| | ELBA | 9,80±0,86 |
| | IMA5 | 9,03±1,36 |
| | PA | 17,87±3,43 |

Tabella 19 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO Contenuto di Polifenoli totali in estratto metanolico di *B.bituminosa*
Risultati medie di tre replicati ±SD.

Questi dati non confermano quelli già presenti in letteratura (Ceccarelli et al., 2010).

Passando dal periodo vegetativo al riproduttivo si nota una maggiore produzione di polifenoli nelle foglie di tutte le piante.

Nelle radici i polifenoli sono presenti solo in tracce (Tabella 20).

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | POLIFENOLI TOT $\mu\text{g/g DW}$ |
|---------------------|----------|-----------------------------------|
| | NM | 0,183 \pm 0,0446 |
| | ELBA | 0,149 \pm 0,0438 |
| | IMA5 | 0,118 \pm 0,0349 |

Tabella 20 RADICI FINE PERIODO contenuto di Polifenoli totali in estratti metanolici di *B.bituminosa*. Risultati medie di tre replicati \pm SD.

9.6. Potere antiossidante

Nel periodo vegetativo il potere antiossidante risulta maggiore in IMA5 (56,32 mg/g FW) anche se il dato ottenuto è simile alla pianta spontanea (PA 55,03 mg/g FW). In NM (49,22 mg/g FW) ed ELBA (40,29 mg/g FW) il potere antiossidante diminuisce (Tabella 21).

| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | POTERE ANTIOX mg/g FW |
|---------------------------|----------|-----------------------|
| | NM | 49,22 \pm 3,80 |
| | ELBA | 40,29 \pm 6,29 |
| | IMA 5 | 56,32 \pm 10,80 |
| | PA | 55,03 \pm 3,14 |

Tabella 21 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO Potere antiossidante foglie di *B.bituminosa* estratte con metanolo Risultati medie di tre replicati \pm SD

Dai dati riportati in tabella si evince che la micorrizzazione con *Glomus intraradices* incrementa il potere antiossidante delle piante; infatti IMA5, oltre ad avere un maggiore attività rispetto ad ELBA e al controllo, risulta più attiva anche delle piante spontanee.

Nel periodo riproduttivo il potere antiossidante risulta maggiore nelle piante spontanee (211,96 mg/g FW) rispetto a quelle coltivate in vaso. Tra queste ELBA risulta essere quella con maggior attività antiossidante (56,89 mg/g FW) (Tabella 22).

Il potere antiossidante nelle piante spontanee risulta quadruplicato rispetto a quelle coltivate in vaso (Tabella 22).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | POTERE ANTIOX mg/g FW |
|--------------------------------|----------|-----------------------|
| | NM | 55,81 ±3,85 |
| | ELBA | 56,89±8,61 |
| | IMA5 | 50,97±3,44 |
| | PA | 211,96±100,73 |

Tabella 22 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO Potere antiossidante foglie di *B.bituminosa* estratte con metanolo
Risultati medie di tre replicati ±SD

Dai dati emerge che la micorrizzazione con *Glomus intraradices* promuove l'aumento del potere antiossidante solo nel periodo vegetativo.

Risulta, inoltre, interessante notare che IMA 5 ed ELBA hanno la stessa attività anche seppur in periodi diversi.

Le radici non mostrano potere antiossidante in quanto i dati ottenuti dalle analisi sono molto bassi (NM 0,09 mg/g FW; ELBA 0,05 mg/g FW; IMA5 0,06 mg/g FW) (Tabella 23).

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | POTERE ANTIOX mg/g DW |
|------------------------|----------|-----------------------|
| | NM | 0,09±0,02 |
| | ELBA | 0,05±0,01 |
| | IMA5 | 0,06±0,01 |

Tabella 23 RADICI FINE PERIODO Potere antiossidante radici di *B.bituminosa* estratte con metanolo
Risultati medie di tre replicati ±SD.

9.7. Determinazione degli pterocarpani

9.7.1. Eribraedina C

Nel periodo vegetativo le foglie delle piante spontanee mostrano il più alto accumulo di eribraedina C (21,63%) rispetto alle piante coltivate in vaso. Tra queste IMA5 mostra una maggiore produzione del metabolita (9,64%) rispetto a NM (5,48%) dove diminuisce di circa 1/3 e ad ELBA (4,04%) dove si dimezza (Tabella 24).

| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | % eri C |
|------------------------------|----------|------------|
| | NM | 5,48±0,70 |
| | ELBA | 4,04± 0,95 |
| | IMA5 | 9,64±1,09 |
| | PA | 21,63±3,56 |

Tabella 24 PERIODO VEGETATIVO: Percentuale dei mg eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di foglie di *B.bituminosa*
Risultati medie di tre replicati ±SD.

Dai dati riportati in tabella si evince che l'inoculo IMA5 promuove l'accumulo di eribraedina C nelle piante coltivate in vaso anche se il valore è comunque più basso delle piante spontanee. I risultati ottenuti dalle piante coltivate in vaso con IMA5 confermano i dati sperimentali già presenti in letteratura dove l'accumulo dei derivati dei composti fenolici è indotto da funghi AM del genere *Glomus* (He et al., 2009; Meng et al., 2001; Tenget al., 2005) in piante di *Salvia mitiorrhiza*.

Nel periodo riproduttivo la concentrazione di eribraedina C risulta essere maggiore nel controllo NM (6,92%) rispetto a ELBA (2,33%) e IMA5 (1,49%). Il valore ottenuto da NM è maggiore anche delle piante spontanee PA (1,91%) (Tabella 25).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | % ery c |
|--------------------------------|----------|-------------|
| | NM | 6,9±0,55 a |
| | ELBA | 2,33±0,69 b |
| | IMA5 | 1,49±0,47 b |
| | PA | 1,91±0,71 |

Tabella 25 PERIODO RIPRODUTTIVO Percentuale dei mg eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di foglie di *B.bituminosa*

Risultati medie di tre replicati ±SD. La significatività dei dati è stata valutata tramite test statistico ANOVA rispetto allo zero ($P<0,001$) esclusa la pianta spontanea PA

Passando dal periodo vegetativo al riproduttivo si osserva che la concentrazione dello pterocarpano diminuisce.

Dai dati riportati in tabella possiamo affermare che la micorrizzazione con l'inoculo IMA5 non promuove l'accumulo del metabolita nel periodo riproduttivo, mentre nel vegetativo si.

Nei fiori la concentrazione di eribraedina C è molto bassa (NM 0,22%; ELBA 0,12%; IMA5 0,25%; PA 0,08%) (Tabella 26).

| FIORI | CAMPIONE | % ery c |
|-------|----------|---------|
| | NM | 0,22 |
| | ELBA | 0,12 |
| | IMA5 | 0,25 |
| | PA | 0,08 |

Tabella 26 FIORI: percentuale dei mg di eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa* periodo riproduttivo
Risultati medie di tre replicati \pm SD.

Nelle radici l'eribraedina C è assente (Tabella 27).

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | % ery c |
|---------------------|----------|---------|
| | NM | 0 |
| | ELBA | 0 |
| | IMA5 | 0 |

Tabella 27 RADICI: percentuale dei mg di eribraedina C contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa*

9.7.2. Bitucarpina A

Nel periodo vegetativo la concentrazione di bitucarpina A risulta maggiore in IMA5 (2,92%) sia rispetto alle altre piante coltivate in vaso (ELBA 2,20 %; NM 2,53%) sia alle piante spontanee (0,33%) dove la concentrazione diminuisce di circa il 70% (Tabella 28).

| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | % bituc a |
|---------------------------|----------|-----------------|
| | NM | 2,53 \pm 1,18 |
| | ELBA | 2,20 \pm 1,10 |
| | IMA5 | 2,92 \pm 0,41 |
| | PA | 0,33 \pm 0,05 |

Tabella 28 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO: percentuale dei mg di bitucarpina A contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa*
Risultati medie di tre replicati \pm SD. La significatività dei dati è stata valutata tramite test statistico ANOVA rispetto allo zero ($P < 0,05$)

I dati ottenuti evidenziano che la micorrizzazione con *G.intraradices* promuove l'accumulo di bitucarpina A e che i valori ottenuti dalle piante in vaso sono maggiori di quelli ottenuti dalle piante spontanee.

I risultati ottenuti dalle piante coltivate in vaso con IMA5 confermano i dati sperimentali già presenti in letteratura dove l'accumulo dei derivati dei composti fenolici è indotto da funghi AM del genere *Glomus* (He et al., 2009; Meng et al., 2001; Tenget al., 2005) in piante di *Salvia miltiorrhiza*.

Nel periodo riproduttivo la concentrazione del metabolita è maggiore in NM (1,22%) rispetto ad ELBA (0,24%), e a IMA5 (0,12%). Il valore ottenuto è più alto anche di quello delle piante spontanee (0,17%) (Tabella 29).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | % bituc a |
|--------------------------------|----------|-------------|
| | NM | 1,22±0,77 a |
| | ELBA | 0,24±0,08 b |
| | IMA5 | 0,12±0,06 b |
| | PA | 0,17±0,07 |

Tabella 29 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO: percentuale dei mg di bitucarpina A contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa*
Risultati medie di tre replicati ±SD. La significatività dei dati è stata valutata tramite test statistico ANOVA ($P<0,05$)

Dai dati in tabella si evince che la micorrizzazione in vaso non promuove l'accumulo di bitucarpina A nel periodo riproduttivo.

Passando dal periodo vegetativo al riproduttivo la concentrazione del metabolita diminuisce drasticamente in tutte le piante.

Nei fiori delle piante coltivate in vaso l'accumulo di bitucarpina è molto basso (NM 0,04%; ELBA 0,001%; IMA5 0,04%), e assente nelle spontanee (Tabella 30).

| FIORI | CAMPIONE | % bituc a |
|-------|----------|--------------|
| | NM | 0,04±0,001 |
| | ELBA | 0,001±0,0001 |
| | IMA5 | 0,04±0,0001 |
| | PA | 0 |

Tabella 30 FIORI: Percentuale dei mg di bitucarpina A contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa* periodo riproduttivo
Risultati medie di tre replicati ±SD.

[Digitare il testo]

Nelle radici la bitucarpina A è assente (Tabella 31).

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | % bituc a |
|------------------------|----------|-----------|
| | NM | 0 |
| | ELBA | 0 |
| | IMA5 | 0 |

Tabella 31 RADICI: percentuale dei mg di bitucarpina A contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa* fine periodo.

9.8. Determinazione del derivato dell'acido idrossicinnamico

9.8.1. Plicatina B

Nel periodo vegetativo le foglie delle piante spontanee (PA) mostrano un maggior accumulo di plicatina B (49,59%) rispetto a quelle coltivate in vaso. Tra queste IMA5 risulta la maggior produttrice (14,52%) rispetto a NM (13,29%) ed ELBA (11,72%) (Tabella 32).

| FOGLIE PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | %Plic B |
|---------------------------|----------|------------|
| | NM | 13,29±3,90 |
| | ELBA | 11,72±4,04 |
| | IMA5 | 14,52±1,58 |
| | PA | 49,59±4,09 |

Tabella 32 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa*
Risultati medie di tre replicati ±SD.

Escludendo le piante spontanee possiamo affermare che l'elicitazione con *Glomus intraradice* promuove l'accumulo del metabolita.

Nel periodo riproduttivo, tra le piante coltivate in vaso, la concentrazione del metabolita è maggiore in NM (21,05%). In ELBA diminuisce di tre volte (6,03%) ed in IMA5 di sette volte (3,12%). Rispetto alle piante coltivate in vaso l'accumulo di plicatina B in PA risulta essere molto più basso (0,71%). L'accumulo del metabolita nelle piante spontanee è più basso rispetto alle piante coltivate in vaso (Tabella 33).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | %Plic B |
|-----------------------------|----------|-----------------|
| | NM | 21,05±7,11 a |
| | ELBA | 6,03±2,67 b |
| | IMA5 | 3,12±1,46 b |
| | PA | 0,71±0,36 |

Tabella 33 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa*
Risultati medie di tre replicati ±SD. La significatività dei dati è stata valutata tramite test statistico ANOVA ($P < 0,05$)

Passando dal periodo vegetativo al riproduttivo si osserva una diminuzione delle produzione di plicatina B in tutte le piante escluso il controllo.

Dai risultati riportati in tabella si evince che la micorrizzazione promuove l'accumulo dei metaboliti solo nel periodo vegetativo.

La plicatina B non viene accumulata né nei fiori, né nelle radici (Tabelle 34-35).

| FIORI | CAMPIONE | %Plic B |
|-------|----------|---------|
| | NM | 0 |
| | ELBA | 0 |
| | IMA5 | 0 |
| | PA | 0 |

Tabella 34 FIORI: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa* periodo vegetativo.

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | %Plic B |
|---------------------|----------|---------|
| | NM | 0 |
| | ELBA | 0 |
| | IMA5 | 0 |

Tabella 35 RADICI: Percentuale dei mg di plicatina B contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa*

9.9. Determinazione delle furanocumarine

9.9.1. Psoralene

Nel periodo vegetativo tra le piante coltivate in vaso ELBA mostra una maggior concentrazione di psoralene (1,56%) rispetto ad IMA5 (0,60%) mentre nel controllo è assente. Nelle piante spontanee l'accumulo della furanocumarina risulta essere più bassa (0,86%) rispetto ad ELBA (Tabella 36).

| PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | % PSORALENE |
|-----------------------|----------|--------------|
| | NM | 0 a |
| | ELBA | 1,56±1,43 b |
| | IMA5 | 0,60±0,19 ab |
| | PA | 0,86±0,04 |

Tabella 36 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO: Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di *B.bituminosa*.

Risultati medie di tre replicati ±SD. La significatività dei dati è stata valutata tramite test statistico ANOVA ($P < 0,05$)

Dai dati ottenuti si evince che l'elicitazione con IMA5 non stimola la produzione del metabolita, mentre è promossa dalle micorrize presenti nel terreno elbano. L'elicitazione con *Glomus intraradices* non conferma i dati presenti in letteratura (Zahao et al., 2009,2011) dove l'accumulo delle cumarine totali, in piante di *Salvia officinalis*, è promosso dai funghi AM del genere *Glomus*.

Nel periodo riproduttivo le foglie delle piante spontanee mostrano una maggiore concentrazione di psoralene (0,48%) rispetto a quelle coltivate in vaso tra cui NM risulta essere la maggior produttrice (0,29%) rispetto ad ELBA (0,04%) ed IMA5 (0,02%) (Tabella 37).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | % PSORALENE |
|--------------------------------|----------|-------------|
| | NM | 0,29±0,12 |
| | ELBA | 0,04±0,01 |
| | IMA5 | 0,02±0 |
| | PA | 0,48±0,01 |

Tabella 37 FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO:Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di *B.bituminosa*

. Risultati medie di tre replicati ±SD.

Nel periodo vegetativo gli inoculi micorrizici non promuovono l'accumulo dello psoralene. I fiori delle piante spontanee mostrano un maggior accumulo di psoralene (0,42%) rispetto alle piante coltivate in vaso (NM 0,09%; ELBA 0,1%; IMA5 0,18%) dove la produzione del metabolita è molto bassa (Tabella 38).

| FIORI | CAMPIONE | % PSORALENE |
|-------|----------|-------------|
| | NM | 0,090±0 |
| | ELBA | 0,10±0 |
| | IMA5 | 0,18±0,01 |
| | PA | 0,42±0,0 |

Tabella 38 FIORI:Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di *B.bituminosa* periodo riproduttivo. Risultati medie di tre replicati ±SD.

Le radici micorrizzate con IMA5 mostrano livelli di psoralene più alti (0,38%) rispetto ad ELBA (0,30%) ed al controllo NM (0,26%) (Tabella 39).

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | % PSORALENE |
|------------------------|----------|-------------|
| | NM | 0,26±0,03 |
| | ELBA | 0,30±0,01 |
| | IMA5 | 0,38±0,03 |

Tabella 39 RADICI:Percentuale dei mg di psoralene contenuto in estratti cloroformici di *B.bituminosa* Fine periodo. Risultati medie di tre replicati ±SD.

[Digitare il testo]

Dai dati riportati in tabella si evince che l'accumulo del metabolita nelle radici è maggiore rispetto a quello nelle foglie nel periodo riproduttivo.

Dai dati presenti in tabella si deduce che lo psoralene viene prodotto principalmente nel periodo vegetativo (Walker et al., 2012). In questo periodo nelle piante coltivate in vaso si osserva una maggiore concentrazione del metabolita rispetto alle piante spontanee.

9.9.2. Angelicina

Nel periodo vegetativo la concentrazione di angelicina risulta essere maggiore in ELBA (29,4%) rispetto sia ad IMA5 (17,51%) che a PA(13,08%). In NM è il metabolita è assente (Tabella 40).

| PERIODO VEGETATIVO | CAMPIONE | % ANGELICINA |
|--------------------|----------|--------------|
| | NM | 0 a |
| | ELBA | 29,40±8,7 b |
| | IMA5 | 17,51±4,3 b |
| | PA | 13,08±0 |

Tabella 40 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO:Percentuale dei mg di angelicina contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa* periodo vegetativo. Risultati medie di tre replicati ±SD. La significatività dei dati è stata valutata tramite test statistico ANOVA ($P<0,05$) esclusa la pianta spontanea PA

Dai dati si evince che le micorrize presenti in ELBA stimolano la produzione di angelicina rispetto ad IMA5. L'elicitazione con *Glomus intraradices* non conferma i dati presenti in letteratura (Zahao et al., 2009,2011). Le piante spontanee mostrano una concentrazione più bassa rispetto alle piante coltivate in vaso.

Nel periodo riproduttivo la furanocumarina risulta maggiormente accumulata in NM (2,84%) rispetto sia alle piante coltivate in vaso ELBA (0,67%) ed IMA5 (0,32%) sia alle piante spontanee (0,83%) (Tabella 41).

| FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO | CAMPIONE | % ANGELICINA |
|-----------------------------|----------|--------------|
| | NM | 2,84±0,12 |
| | ELBA | 0,67±0,03 |
| | IMA5 | 0,32±0,09 |
| | PA | 0,83±0,07 |

Tabella 41FOGLIE PERIODO RIPRODUTTIVO Percentuale dei mg di angelicinae contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa* periodo riproduttivo. Risultati medie di tre replicati ±SD

Passando dal periodo vegetativo al riproduttivo si osserva una drastica diminuzione di angelicina nelle foglie escluso NM. Nel periodo vegetativo la produzione di angelicina è stimolata dalle micorrize presenti nel terreno raccolto all'Isola d'Elba.

Dall'analisi HPLC si evince, inoltre, che i risultati ottenuti confermano quelli presenti in letteratura (Walker et al., 2012), in quanto l'angelicina è maggiormente accumulata nel periodo vegetativo, rispetto al riproduttivo dove diminuisce drasticamente.

L'accumulo di angelicina nei fiori è maggiore nelle piante spontanee (14,66%) rispetto a quello delle piante coltivate in vaso. Tra queste IMA5 promuove un maggior accumulo (3,76%) (Tabella 42).

| FIORI | CAMPIONE | % ANGELICINA |
|-------|----------|--------------|
| | NM | 2,35±0,43 |
| | ELBA | 2,30±0,56 |
| | IMA5 | 3,76±0,76 |
| | PA | 14,66±3,09 |

Tabella 42 FIORI:Percentuale dei mg di angelicinae contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa* periodo riproduttivo. Risultati medie di tre replicati ±SD.

Dai dati riportati in tabella si evince che l'elictazione con *G. intraradices* promuove un maggior accumulo di angelicina nei fiori delle piante coltivate in vaso. Questi valori risultano essere più alti di quelli ottenuti dalle foglie del periodo riproduttivo.

La micorrizzazione stimola l'accumulo di angelicina nelle radici, infatti in IMA5 è stato registrato un maggior accumulo (10,35%), mentre in ELBA ed NM è diminuisce rispettivamente del 20% e del 30% (8,01% e 7,75%) (Tabella 43). Questo dato è molto interessante e non ancora riportato in letteratura.

| RADICI FINE PERIODO | CAMPIONE | % ANGELICINA |
|---------------------|----------|--------------|
| | NM | 7,75±1,2 |
| | ELBA | 8,01±1,7 |
| | IMA5 | 10,35±3 |

Tabella 43 RADICI:Percentuale dei mg di angelicinae contenuta in estratti cloroformici di *B.bituminosa*. Fine periodo. Risultati medie di tre replicati ±SD.

Dai dati in tabella si deduce che aneglicina e psoralene non sono prodotti in uguale misura dalla pianta, in quanto il livello di angelicina nelle foglie è più alto del 20% rispetto a quello dello psoralene (Innocenti et al., 1997).

9.10. Determinazione dell' isoflavonoide

9.10.1. Genisteina

La genisteina risulta presente, in minime concentrazioni, solo nelle foglie di ELBA ed IMA5 nel loro periodo riproduttivo (Tabella 44). Questi dati non confermano quelli presenti in letteratura dove la genisteina è stata isolata sia dalle parti aeree della pianta (Pistelli et al., 2003) che dalle radici (Amit et al., 2010).

| | CAMPIONE | % GENISTEINA |
|---------------------------|--------------|--------------|
| PERIODO VEGETATIVO | NM | 0 |
| | ELBA | 0 |
| | IMA5 | 0 |
| | PORTICCILOLO | 0 |
| PERIODO RIPRODUTTIVO | NM | 0 |
| | ELBA | 0,08 |
| | IMA5 | 0,13 |
| | PA | 0 |
| FIORI | NM | 0 |
| | ELBA | 0 |
| | IMA5 | 0 |
| | PA | 0 |
| RADICI FINE PERIODO | NM | 0 |
| | ELBA | 0 |
| | IMA5 | 0 |

Tabella 44 FOGLIE PERIODO VEGETATIVO, FOGLIE FIORI RADICI PERIODO RIPRODUTTIVO
Percentile dei mg di genisteina contenuta in festratti cloroformici di *B.bituminosa*
Nel periodo riproduttivo, in foglie
e fiori del periodo vegetativo e radici di fine periodo.
isultati medie di tre replicati \pm SD.

9.11. Composti volatili

I composti volatili determinati dall'analisi SPME sono riportati in tabella (Tabella 46).

Confrontando i dati ottenuti tramite analisi SPME delle foglie si deduce che:

- Lo spazio di testa relativo dopo esposizione della fibra per 20 minuti all'aria emessa dalle foglie di *B.bituminosa* elicitate con *G. intraradices* (IMA5) è risultato essere costituito per il 31,73% da monoterpeni (Figura 89) in particolare monoterpeni non ossigenati sono la classe chimica maggiormente presente con una percentuale di pari al 30,98% mentre gli ossigenati solo lo 0,78%. Il composto maggiormente presente è risultato essere il triciclene (11,09%). Contenuti relativamente abbondanti si sono riscontrati anche per santolina triene (4,63%), camfene (6,82%), mircene (3,30%) limonene (1,89). Anche i sesquiterpeni vengono prodotti in buona percentuale, ma sono comunque più bassi delle piante non micorrizzate

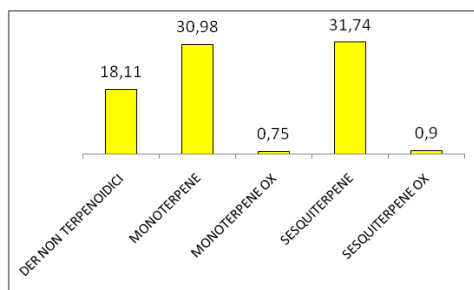


Figura 89 Principali classi chimiche SPME foglie di *B. bituminosa* (IMA5)

- Lo spazio di testa relativo dopo esposizione della fibra per 20 minuti all'aria emessa dalle foglie di *B.bituminosa* elicitate con le micorrize elbane (ELBA) è risultato essere costituito per il 71,66% dai derivati non terpenoidici (Figura 90) Il composto maggiormente presente è risultato essere lo Z-3-hexenol-acetato (63,83%). Contenuti relativamente abbondanti si sono riscontrati anche per Z-3-hexenyl butirato (1,16) presente solo in queste piante ed assente in NM ed IMA5

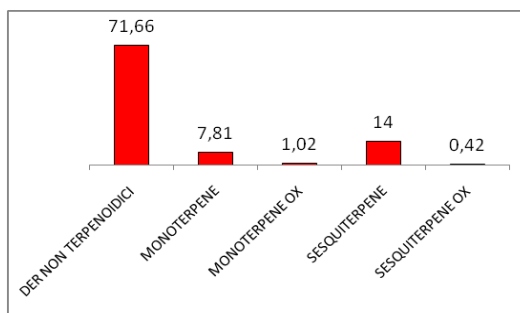


Figura 90 Principali classi chimiche SPME foglie di *B. bituminosa* (ELBA)

- Lo spazio di testa relativo dopo esposizione della fibra per 20 minuti all'aria emessa dalle foglie di *B. bituminosa* non micorrizate (NM) è risultato essere costituito per il 44,6% da sesquiterpeni (Figura 89) in particolare monoterpeni non ossigenati sono la classe chimica maggiormente presente con una percentuale di pari al 42,61% mentre gli ossigenati solo l'1,99%. Il composto maggiormente presente è risultato essere E- β -farnesene (21,12%). Contenuti relativamente abbondanti si sono riscontrati anche per il β -cariofillene (8,93%). L'unica eccezione è il germacrene D maggiormente prodotto da IMA5 (5,40%) rispetto a NM (2,75%) (Tabella 46)

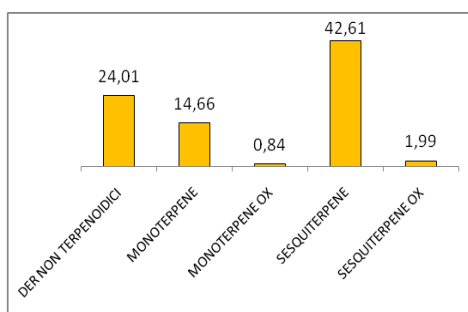


Figura 91 Principali classi chimiche SPME foglie di *B. bituminosa* (NM)

| Compound | Rt (min) | KI | NM | ELBA | IMA5 |
|---------------------------------------------------|----------|------|--------|--------|--------|
| 1,3 Butanediol | 2,57 | 769 | | t | |
| (E)- 3-hexen-1-ol | 3,39 | 851 | | 2,94 | |
| santolina triene | 4,65 | 908 | 1,89 | 0,70 | 4,63 |
| Tricyclene | 4,89 | 926 | 4,75 | | 11,09 |
| α -pinene | 4,90 | 939 | | 2,54 | |
| Camphene | 5,20 | 953 | 3,01 | 1,39 | 6,82 |
| Sabinene | 5,99 | 976 | 0,25 | 0,36 | 0,60 |
| Myrcene | 6,32 | 991 | 2,13 | 1,91 | 3,30 |
| (Z)- 3-hexenol acetate | 6,78 | 1016 | 12,36 | 63,83 | 10,78 |
| Limonene | 7,48 | 1031 | 1,69 | 0,62 | 1,89 |
| (E)- β -ocimene | 8,11 | 1050 | 0,94 | 0,29 | 2,65 |
| 1-Octanol | 9,54 | 1070 | 0,11 | | |
| N-Undecane (C11) | 9,95 | 1100 | 0,27 | | |
| <i>n</i> -Nonanal | 10,14 | 1102 | 2,27 | 0,20 | 0,34 |
| phenil etil alcohol (phenetol) | 10,50 | 1110 | 0,21 | 0,40 | 0,19 |
| (Z)-3-hexenyl isobutyrate (isobutanoat) | 11,71 | 1145 | | 0,11 | 0,13 |
| (Z)-3-hexenyl butyrate | 13,47 | 1186 | | 1,61 | |
| Methyl salicilato | 13,74 | 1190 | 0,12 | | |
| <i>n</i> -dodecane | 14,00 | 1199 | 0,57 | 0,25 | 0,32 |
| <i>n</i> -decanal | 14,27 | 1204 | 1,13 | 0,28 | 0,76 |
| geraniol | 16,35 | 1255 | | 0,24 | |
| heptadecene | | | | 0,11 | |
| <i>n</i> -tridecane (cis) | 18,31 | 1299 | 0,74 | 0,38 | 0,95 |
| <i>trans</i> -carvyl acetate (methylanthranylate) | 20,04 | 1337 | | 0,11 | 0,38 |
| cyclosativene | 21,06 | 1368 | 0,51 | 0,17 | |
| α -copaene | 21,52 | 1376 | 2,53 | 1,42 | 1,61 |
| geranyl acetate | 21,96 | 1383 | 0,84 | 0,67 | 0,37 |
| linalol isobutirrate | 21,96 | | | | |
| β -elemene | 22,25 | 1391 | 1,02 | 0,37 | 0,99 |
| ethyl-decanoate | 22,50 | 1394 | 1,87 | 0,47 | 1,36 |
| <i>n</i> -tetradecane | 22,62 | 1399 | 0,70 | 0,26 | 0,66 |
| dodecanal | 23,01 | 1407 | 0,63 | 0,12 | 0,35 |
| β -caryophyllene | 23,33 | 1418 | 8,93 | 2,22 | 4,26 |
| β -copaene | 23,77 | 1429 | 0,32 | 0,20 | 0,32 |
| α -humulene | 24,79 | 1454 | 2,27 | 0,54 | 1,17 |
| (E)- β -farnesene | 25,03 | 1454 | 21,12 | 5,28 | 14,85 |
| γ -muurulene | 25,78 | 1477 | 0,65 | 0,27 | 0,53 |
| germacrene D | 25,95 | 1481 | 2,75 | 2,47 | 5,40 |
| bicyclogermacrene | 26,62 | 1494 | 0,27 | 0,26 | 0,51 |
| α -muurulene | 26,80 | 1499 | 0,78 | 0,33 | 0,83 |
| (E,E)- α -farnesene | 27,16 | 1508 | 0,78 | 0,23 | 0,40 |
| butylated hydroxytoluene | 27,33 | 1512 | 1,79 | 0,44 | 1,17 |
| δ -cadinene | 27,72 | 1524 | 0,68 | 0,24 | 0,87 |
| (Z)-3-hexenyl benzoate | 29,64 | 1570 | 0,55 | 0,13 | 0,42 |
| germacrene D-4-ol | 29,79 | 1574 | 0,31 | 0,11 | 0,21 |
| caryophyllene oxide | 30,02 | 1581 | 1,68 | 0,31 | 0,69 |
| <i>n</i> -hexadecane (C16) | 30,82 | 1600 | 1,11 | 0,23 | 0,65 |
| TOTALE | | | 84,53% | 95,01% | 82,45% |

Tabella 45 SPME composti volatili foglie periodo riproduttivo *B.bituminosa*

Il confronto tra le piante coltivate in vaso (elicitate) e quelle spontanee (Bertoli et al., 2004) mette in evidenza che i principali composti volatili sono presenti in concentrazioni diverse per esempio il quantitativo di triciclene, di limonene, di E- β -farnesene e di α -umulene sono maggiore in IMA5 (Figura 46) rispetto alle piante spontanee (Bertoli et al., 2004). Le micorrize elbane, invece, stimolano una maggiore produzione di E-3-exenol, di Z-3-exenol-ol acetato

Dal confronto con la letteratura si evince che la micorrizzazione causa variazioni della composizione dei composti volatili presenti nelle foglie rispetto a quella delle piante spontanee (Bertoli et al., 2004) in quanto alcuni metaboliti presenti solo nelle piante in vaso ed assenti nelle spontanee (Bertoli et al., 2004).

Il mircene ed il δ -cadinene, l' *n*-nonanal, l' etil-decanoato, *n*-exanoacetate, Z-3-hexenyl benzoate etil-decanoato, *n*-exanacetate ed β -elemene sono presenti sia in ELBA che IMA5, ma assenti nelle piante spontanee.

Il 3-E-hexenol-1-acetate e lo Z-3-exenilbutirrato sono presenti, invece, solo in ELBA.

10. CONCLUSIONI

Le piante appartenenti al genere *Bituminaria* costituiscono una preziosa fonte di metaboliti secondari, alcuni dei quali possiedono importanti attività farmacologiche.

La produzione su scala commerciale di alcuni composti presenti in *B.bituminosa* può essere richiesta dall'industria farmaceutica.

Tra i diversi metodi per incrementare la produzione di metaboliti secondari, l'elicitazione con agenti biotici, tra cui l'uso di funghi AM, può rivelarsi efficace e soprattutto in rispetto con l'ambiente.

Questo è un lavoro preliminare atto a valutare se la micorrizzazione promuove la produzione dei principali metaboliti secondari presenti in *B.bituminosa*, e quindi definire un protocollo per l'ottenimento di maggiori rese dei composti principali.

Le prove sono state condotte in vaso impiegando una quantità di terreno limitata, con una colonizzazione circoscritta delle AM e confrontate con le piante spontanee cresciute nei terreni dell'Isola d'Elba. Sono stati impiegati due inoculi, IMA5, commerciale, ed ELBA, indigeno.

Entrambi gli inoculi, in particolare IMA5, sono risultati efficaci ed hanno colonizzato le radici delle piante in vaso.

È importante sottolineare che l'inoculo ELBA non è costituito da un unico fungo AM, come nel caso di IMA5, ma da diversi funghi a noi sconosciuti che promuovono un maggior apporto di sostanze nutritive alla pianta ospite favorendo un incremento nella produzione e nell'accumulo di metaboliti secondari.

L'incremento della biomassa è stato valutato in base al numero delle foglie, alla loro lunghezza, al numero ed alla lunghezza degli steli. Gli inoculi favoriscono un aumento di biomassa, in particolare IMA5 nelle fasi iniziali della crescita, mentre ELBA necessita di tempi più lunghi per promuovere lo sviluppo della pianta nel vaso in cella climatica. Sono stati confrontati esclusivamente i risultati delle piante cresciute in vaso.

L'accumulo di clorofilla e carotenoidi è influenzato dai funghi AM: *Glomus intraradices* promuove la produzione di clorofilla b e dei carotenoidi nel periodo vegetativo mentre, nel periodo riproduttivo i funghi indigeni (ELBA). Nell'insieme dello sviluppo della pianta ELBA favorisce una maggiore produzione di entrambi i pigmenti.

Un indice comunemente preso in considerazione per valutare l'interesse di molte industrie è il potere antiossidante degli estratti vegetali. Il potere antiossidante è promosso nelle foglie sia da IMA5, nel periodo vegetativo, che da ELBA nel periodo riproduttivo. Risulta interessante notare che le foglie di entrambe le piante hanno lo stesso potere antiossidante seppur in periodi diversi.

L'accumulo dei flavonoidi totali e dei polifenoli totali, responsabili del potere antiossidante della pianta, è maggiore nelle foglie delle piante nel periodo riproduttivo ed è favorito dall'inoculo ELBA.

Nelle radici i flavonoidi totali ed i polifenoli totali sono presenti solo in tracce.

Ulteriori analisi per la ricerca dei principali metaboliti secondari sono stati condotti con HPLC.

Dall'analisi HPLC di foglie, radici e fiori si evince che l'accumulo dei metaboliti secondari varia nei due stadi della pianta (vegetativo e riproduttivo) e non sempre è promosso dallo stesso fungo AM.

Glomus intraradices (IMA5) promuove l'accumulo dei due pterocarpani (eribraedina C e bitucarpina A), del derivato dell'acido idrossicinnamico (plicatina B) nelle foglie nelle periodo vegetativo e della furanocumarina angelicina nei fiori e nelle radici.

I Funghi indigeni (ELBA), cioè presenti nel terreno dove crescono spontaneamente le piante di *B.bituminosa*, promuovono principalmente l'accumulo delle furanocumarine (psoralene ed angelicina) nelle foglie nel periodo vegetativo.

L'analisi HPLC ha rilevato, invece, l'assenza dell'isoflavone genisteina in tutte le parti della pianta con eccezione delle foglie, nel periodo riproduttivo, di IMA5 ed ELBA dove l'accumulo è comunque molto basso.

Talvolta confrontando i dati ottenuti con quelli misurati nelle piante spontanee si osserva una generale minore concentrazione dei metaboliti. Questo è imputabile al tipo di coltivazione effettuata: in vaso (con limitato terreno), in condizioni controllate ed in serra, mentre le spontanee dispongono di maggior terreno e condizioni ambientali variabili.

L'unica eccezione è rappresentata dalle furanocumarine che risultano promettenti per l'elicitazione.

Dall'analisi SPME delle foglie si deduce che *Glomus intraradices* (IMA5) promuove l'accumulo di monoterpeni, mentre ELBA la produzione di composti non terpenoidici. La micorrizzazione favorisce un maggior accumulo dei principali composti volatili rispetto

alle piante spontanee e presenta una diversa composizione, perché alcuni metaboliti sono presenti nelle foglie delle piante micorrizzate ed assenti in quelle delle piante spontanee.

In futuro potrebbe essere interessante effettuare ulteriori studi per esempio determinare quali funghi AM colonizzano i terreni dove crescono spontaneamente le piante di *B.bituminosa* per poter effettuare nuove prove finalizzate, con ceppi selezionati, ad una maggiore produzione di metaboliti secondari, in particolare psoralene ed angelicina, responsabili per altro di molti effetti farmacologici.

BIBLIOGRAFIA

- Innocenti G., Piovan A., Filippini R., Caniato R., Cappelletti E.M.. Quantitative Recovery of Furanocoumarins from *Psoralea bituminosa*. *Phytochemical Analysis* **1997**; 8,2:84-86
- Tava A, Pecetti L, Ricci M, Pagnotta MA, Russi L. Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. *Flavour and Fragrance Journal* **2007**; 22:363-370
- Pistelli L, Noccioli C, Appendino G, Bianchi F, Sterner O, Ballero M (2003) Pterocarpanes from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*. *Phytochemistry*, **2003**; 64:595-598
- Zhao Luhua, Huang Chaoyu, Shan Zhen, Xiang Bingren, Mei Linghua. *Fingerprint analysis of Psoralea corylifolia L. by HPLC and LC-MS*. *Journal of Chromatography B*, **2005**; 821,1:67-74
- Hamend A.I., Springuel I., El-Emary N.A., Mitome H., Yamada Y. A phenolic cinnamate dimer from *Psoralea plicata*. *Phytochemistry*, **1997**; 45 (6):1257-1261
- Innocenti G., Cappelletti E.M., Caporale G. Furocoumarin contents in the vegetative organs of cultivated *Psoralea* species. *International Journal of Pharmacognosy* **1991**, 29:311-316
- Cappelletti E.M., Innocenti G., Caporale G. Possible ecological significance of within-fruit and seed furocoumarin distribution in two *Psoralea* species. *Journal of Chemical Ecology* **1992** 18 (2):155-164
- Khatune Naznin A., Ekramul Islam M., Ekramul Haque M., Khondkar Proma, Mukhlesur Rahman M. *Antibacterial compounds from the seeds of Psoralea corylifolia*. *Fitoterapia*, **2004**; 75:228-230
- Wang X., Wang Y., Yuan J., Sun Q., Liu J., Zheng C. An efficient new method for extraction, separation and purification of psoralen and isopsoralen from *Fructus Psoraleae* by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr A* **2004**; 1055:135-140
- Hsu Yun-Ting, Wu Chih-Jen, Chen Jing-Ming, Yang Yuh-Cheng, Wang Sung-Yuan. The Presence of Three Isoflavonoid Compounds in *Psoralea corylifolia*. *Journal of chromatographic science* **2001**; 39 (10): 441-444
- Gupta G.K., Suri J.L., Gupta B.K., Dhar K.L. *Bakuchalcone, a dihydrofuranochalcone from the seeds of Psoralea corylifolia*. *Phytochemistry* **1982**; 21 (8):2149-2151
- Tsai W.J., Hsin W.C., Chen C.C. *Antiplatelet Flavonoids from Seeds of Psoralea corylifolia*. *Journal of natural products*, **1996**; 59 (7):671-672

Suri J.L, Gupta G.K., Dhar K.L., Atal Bavachromanol C.K. *A new chalcone from the seeds of Psoralea corylifolia*. Phytochemistry, 1980

Haraguchi H., Inoue J., Tamura Y., Mizutani K. *Antioxidant components of Psoralea corlifolia (Leguminosae)*. Phytother Res, **2002**; 16:539-544

Yin S., Fan C.Q., Wang ., Dong L., Yue J.M., *Antibacterial prenylflavone derivates from Psoralea corylifolia and their structure-activity relationship study*. Bioog Med Chem, **2004**; 12:4387-4392

Jiangning G., Xinchu W., Hou W., Qjnghua L., Kaishun B. *Antioxidants from a Chinese medicinal Herb – Psoralea corylifolia*. Food Chemistry, **2005**; 91: 287-292

Peng G., Wu P., Chen D., Li H. *Neo psoralen isolated from Psoralea corylifolia L*. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, **1996**; 31-34

Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, Snapka RM. *Dna polymerase and topoisomerase II inhibitors from psoralea corylifolia*. J Nat Prod, **1998**; 61: 362-366

Suri JL, Gupta GK, Dhar KL, Atal CK. *Psoralenol: A new isoflavone from the seeds of Psoralea corylifolia*. Phytochemistry, **1978**.

Gupta G.K., Dhar K.L., Atal C.K. *Corylinal: a new isoflavone from seeds of Psoralea corylifolia*. Phytochemistry, **1978**; 17:164.

Dhar KL, Suri JL, Atal CK. *Corylinal: a new isoflavone from seeds of psoralea corylifolia*. Phytochemistry, **1978**; 17: 164

Ruan B., Kong LY, Takaya Y, Niwa M. *Studies on the chemical constituent of >Psoralea corylifolia L*. J. Asian NAd Prod Res, **2007**; 9 (1):41-44

Marco Leonti, Laura Casu, Jürg Gertsch, Leonardo Bonsignore, Costantino Floris, Mariano Casu, Filippo Cottiglia. *A pterocarpan from the seeds of Bituminaria morisiana*. Journal of Natural Medicines, **2010**; 64(9):354-357

Labbé Cecilia, Faini Francesca, Coll Joseph, Connolly Joseph D. *Bakuchiol derivatives from the leaves of Psoralea glandulosa*. Phytochemistry, **1996**; 42(5):1299-1303

Backhouse C Nadine, Delporte Carla L, Negrete Rosa E, Erazo Silvia, Zuñiga Alexandra, Pinto Alvaro, Cassels Bruce K. *Active constituents isolated from Psoralea glandulosa L. with antiinflammatory and antipyretic activities*. Journal of Ethnopharmacology **2001**; 78 (1):27-31

Jiangning G, Xinchu W, Hou W, Qinghua L, Kaishun B. *Antioxidants from a Chinese medicinal herb Psoralea corylifolia*. Food Chem, **2005**; 91:287–92

Peng G, Wu P, Chen D, Li H. *Neo psoralen isolated from Psoralea corylifolia Linn*, 8. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, **1996**; 31–4

Rangari VD, Agrawal SR. *Chemistry and pharmacology of Psolarea corylifolia*. Ind Drugs, **1992**; 29:662

El-Seedi Hesham, Zayed Mervat, Roshdy Shima, Salem Mohamed, Hawata Mohamed, El-Essawy Farag, El-Barbary Mai, El-Kousy Salah. *Analysis of the essential oil from the aerial parts of Psoralea pubescence(Miq.) Standl and its antibacterial activity.* Medicinal Chemistry Research, **2010**; 19 (9): 1036-1042

Bondarenko AS, Aizenman BE, Prikhod'ko VA, Meshcheriakov AA, Skorobogat'ko TI. *Antibiotic properties of the essential oil of Psoralea drupacea BGE.* Mikrobiol Zh., **1972** 34(5):612-6

Haskins, F. A. and Gorz, H. J. *A reappraisal of the relationship between free and bound coumarin in Melilotus.* Crop Sci, **1961**; 1: 320–323

Dua Virendra K, Kumar Arvind, Pandey Akhilesh C and Sandeep Kumar. *Insecticidal and genotoxic activity of Psoralea corylifolia Linn. (Fabaceae) against Culex quinquefasciatus Say, 1823.* Parasites & Vectors **2013**; 6:30

Walker David J., Martínez-Fernández Domingo, Correal Enrique, Romero-Espinar Pascual, Del Río José Antonio. *Accumulation of furanocoumarins by Bituminaria bituminosa in relation to plant development and environmental stress*

Alessandra Bertoli, Francesco Menichini, Cecilia Noccioli, Ivano Morelli Luisa Pistelli. *Volatile constituents of different organs of Psoralea bituminosa L. Flavour and Fragrance Journal, 2004; 19(2): 166-171*

Tava A, Pecetti L, Ricci M, Pagnotta MA, Russi L (2007) *Volatile compounds from leaves and flowers of Bituminaria bituminosa (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. Flavour and Fragrance Journal 22, 363-370*

Tsai Wei-Jern, Hsin Wen-Chi and Chen Chien-Chih. *Antiplatelet Flavonoids from Seeds of Psoralea corylifolia. J. Nat. Prod., 1996; 59 (7): 671–672*

Latha P.G. e Panikkar K.R. *Inhibition of chemical carcinogenesis by Psoralea corylifolia seeds.* Journal of Ethnopharmacology, **1999**; 68 (1-3); 295-298

Backhouse C Nadine, Delporte Carla L, Negrete Rosa E, Erazo Silvia, Zuñiga Alexandra, Pinto Alvaro, Cassels Bruce K. *Active constituents isolated from Psoralea glandulosa L. with antiinflammatory and antipyretic activities.* Journal of Ethnopharmacology, **2001**; 78 (1): 27-31

Fenaroli L. In Flora Mediterranea, Atlante Natura Giunti. Giunti: Florence, **1998**

Maccioni S, Marchini G. In Liguria in Parole: Valle Nervia e RoJa. Sagep: Genoa, **1998**

Zobel Alicia M, Brown Stewart A., March Raymond E. *Histological localization of psoralens in fruits of Psoralea bituminosa.* Canadian Journal of Botany, **1991**; 69(8): 1673-1678

Nguyen Christophe, Bourgaud Frédéric, Forlot Paul, Guckert Armand. *Establishment of hairy root cultures of Psoralea species.* Plant Cell Reports, **1992**; 11 (8): 424-427

- Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier G., Kellner S., Matern U. *Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes*. *Phytochemistry Reviews*, **2006**; 5 (2-3): 293-308
- Naznin A. Khatune, M. Ekramul Islam, M. Ekramul Haque, Proma Khondkar, M. Mukhlesur Rahman. *Antibacterial compounds from the seeds of Psoralea corylifolia*. *Fitoterapia*, **2004**; 75(2): 228-230
- Chanda S., Kaneria M and Nair R. *Antibacterial activity of Psoralea corylifolia L. Seed and Aerial part with Various Extraction Methods*. *Research Journal of Microbiology*, **2011**; 6 (2): 124-131
- Zhang Bang-Le, Fan Cheng-Qi, Dong Lei, Wang Fang-Dao, Yue Jian-Min. *Structural modification of specific antimicrobial lead against Helicobacter pylori discovered from traditional Chinese medicine and a structure activity relationship study*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**; 45: 5258-5264
- Madrid Alejandro, Espinoza Luis, González Cesar, Mellado Marco, Villena Joan, Santander Rocío, Silva Viviana, Montenegro Iván. *Antifungal study of the resinous exudate and of meroterpenoids isolated from Psoralea glandulosa (Fabaceae)*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2012**; 144: 809-811
- Hesham El-Seedi, Mervat Zayed, Shimaa Roshdy, Mohamed Salem, Mohamed Hawata, Farag El-Essawy, Mai El-Barbary, Salah El-Kousy. *Analysis of the essential oil from the aerial parts of Psoralea pubescence (Miq.) Standl and its antibacterial activity*. *Medicinal Chemistry Research*, **2010**; 19(9): 1036-1042
- Dhar Preeti, Gembitsky Igor, Rai Prashant Kumar, Rai Nilesh K., Rai A.K., Watal Geeta. *A Possible Connection Between Antidiabetic & Antilipemic Properties of Psoralea corylifolia Seeds and the Trace Elements Present: A LIBS Based Study*. *Food Biophysics*, **2013**; 8(2): 95-103
- Wang D, Li F, Jiang Z. *Osteoblastic proliferation stimulating activity of Psoralea corylifolia extracts and two of its flavonoids*. *Planta Med*, **2001**;67(8):748-9
- Ming-Jaw Don, Lie-Chwen Lin, Wen-Fei Chiou. *Neobavaisoflavone stimulates osteogenesis via p38-mediated up-regulation of transcription factors and osteoid genes expression in MC3T3-E1 cells*. *Phytomedicine*, **2012**; 19 (6): 551-561
- Latha PG, Evans DA, Panikkar KR, Jayavardhanan KK. *Immunomodulatory and antitumour properties of Psoralea corylifolia seeds*. *Fitoterapia* **2000**;71:223-31
- Bronikowska Joanna, Szliszka Ewelina, Jaworska Dagmara, Czuba Zenon P. and Krol Wojciech. *The Coumarin Psoralidin Enhances Anticancer Effect of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)*. *Molecules*, **2012**; 17(6): 6449-6464
- Guo J, Wu H, Weng X, Yan J, Bi K. *Studies on extraction and isolation of active constituents from Psoralea corylifolia L. and the antitumor effect of the constituents in vitro*. *Zhong Yao Cai* **2003**;26(3):185-7

Yang Hee Jung, Youn HyeSook, Seong Ki Moon, Yun Young Ju, Kim Wanyeon, Kim Young Ha, Lee Ji Young, Kim Cha Soon, Jin Young-Woo, Young BuHyun. *Psoralidin, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX, regulates ionizing radiation (IR)-induced pulmonary inflammation*. Biochemical Pharmacology, **2011**; 82:524-534

Lim Sun-Hye, Ha Tae-Youl, Ahn Jiyun, Kim Suna. *Estrogenic activities of Psoralea corylifolia L. seed extracts and main constituents*. Phytomedicine, **2011**; 18(5):425-430

Zhang CZ, Wang SX, Zhang Y, Chen JP, Liang XM. *In vitro estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms*. J Ethnopharmacol **2005**;98:295–300

Yang YM, Hyun JW, Sung MS, Chung HS, Kim BK, Paik WH, et al. *The cytotoxicity of psoralidin from Psoralea corylifolia*. Planta Med, **1996**;62(4):353–4

Kubo M, Dohi T, Odani T, Tanaka H, Iwamura J. *Cytotoxicity of Corylifoliae fructus. I. Isolation of the effective compound and the cytotoxicity*. Yakugaku Zasshi **1989**;109(12):926–31

Cho H, Jun JY, Song EK, Kang KH, Baek HY, Ko YS, et al. *Bakuchiol: a hepatoprotective compound of Psoralea corylifolia on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells*. Planta Med **2001**;67(8):750–1

Yin S, Fan CQ, Dong L, Yue JM. *Psoracorylifols A–E, five novel compounds with activity against Helicobacter pylori from seeds of Psoralea corylifolia*. Tetrahedron **2006**;62:2569–75.

Tesauro Cinzia, Fiorani Paola, D'annessa Ilda, Chilemmi Giovanni, Turchi Gino, Desideri Alessandro. *Erybraedin C, a natural compound from the plant Bituminaria bituminosa, inhibits both the cleavage and religation activities of human topoisomerase I*. Biochem. J, **2010**; 425:531-539

Maurich, T., Iorio, M., Chimenti, D. and Turchi, G. *Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpanes purified from Bituminaria bituminosa, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR- and p53-proficient and deficient in a dose, time, and structure-dependent fashion*. Chem. Biol. Interact, **2006**;.159:104–116

Maurich, T., Pistelli, L. and Turchi, G. *Anti-clastogenic activity of two structurally related pterocarpanes purified from Bituminaria bituminosa in cultured human lymphocytes*. Mutat. Res., **2004**; 561, 75–81

Turchi, G., Alagona, G. and Lubrano, V. *Protective activity of plicatin B against human LDL oxidation induced in metal ion-dependent and -independent processes. Experimental and theoretical studies*. Phytomedicine, 2009; 16, 1014–1026

Smith and Douglas, 1987

Giovannetti M, Avio L. *Biotechnology of Arbuscular Mycorrhizas*. In: KhachatouriansGG, AroraDK, eds. *Applied mycology and biotechnology*. Agriculture and food production, **2002**; 2:275–310

- Whipps John M. *Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens*. Canadian Journal of Botany, **2004**; 82(8): 1198-1227
- Augè RM. *Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Mycorrhiza, **2001**; 11 (1): 3-42
- Evelin Heikham, Kapoor Rupam and Giri Bhoopander. *Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review*. Annals of botany, **2009**; 104(7):1263-1280
- Giovannetti M, Gianinazzi-Pearson V. *Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi*. Mycological Research, **1994**; 98(7):705-715
- Jansa J., Mozafar A., Anken T., Ruh R., Sanders I., Frossard E. *Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil*. Mycorrhiza, **2002**; 12(5):225-234
- Simard Suzanne W., Perry David A., Jones Melanie D., Myrold David D., Durall Daniel M. and Molina Randy. *Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field*. Nature, **1997**; 388:579-582
- Remy W., T N Taylor, Hass H., and Kerp H. *Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae*. PNAS, **1994**; 91(25):11841-1184
- Simon Luc, Bousquet Jean, Lévesque Roger, Lalonde Maurice. *Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants*. Nature, **1993**; 363:67-69
- Redecker Dirk, Kodner Robin, Graham Linda E. *Glomalean Fungi from the Ordovician*. Science, **2000**; 289(5486):1920-1921
- Giovannetti M. *Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth*. In: Kapulnick Y, Douds DD, eds. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers **2000**, 47–68
- Giovannetti Manuela, Sbrana Cristiana, Citeresi Anna Silvia and Avio Luciano. *Analysis of factors involved in fungal recognition response to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi*. New Phytologist, **1996**; 133:65-71
- Akiyama Kohki, Matsuzaki Ken-ichi & Hayashi Hideo. *Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi*. Nature, **2005**; 435:824-827
- Giovannetti Manuela, Sbrana Cristiana, Logi Cable. *Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi*. New phytologist, **1994**; 127:703-709
- Gollotte A., Gianinazzi-Pearson V., Giovannetti M., Sbrana C., L, Gianinazzi S. *Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a 'locusa' myc mutant of Pisum sativum L*. Planta, **1993**; 191:112-122

Smith SE., Gianinazzi-Pearson. *Physiological Interactions Between Symbionts in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Plants*. Plant Biology, **1988**; 39:221-224

Jeffries Peter, Gianinazzi Silvio, Perotto Silvia, Turnau Katarzyna, Barea José-Miguel. *The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility*. Biology and Fertility of Soils, **2003**; 37(1): 1-16

Wright S.F., Upadhyaya A. *A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi*. Plant and Soil, **1998**; 198 (1): 97-107

Rillig Matthias C. Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters*, **2004**; 4(8):740-754

Van Der Heijden Marcl G.A., Streitwolf-Engel Ruth, Riedl Ralph, Siegrist Sabine, Neudecker Angelica, Ineichen Kurt, Boller Thomas, Wiemken Andres, Sanders Ian R. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, **2006**;172(4): 739–752

Bedini Stefano, Avio Luciano, Argese Emanuele, Giovannetti Manuela. *Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein*. Agriculture, Ecosystems & Environment, **2007**;120(2-4): 463–466

Azcón-Aguilar C., Barea J.M. *Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved*. Mycorrhiza, **1996**; 6(6):457-464

Baltruschat H., Schönbeck F. The influence of endotrophic mycorrhiza on the infestation of tobacco by *Thielaviopsis basicola*.

Bethlenfalvay G. J., Schüepp H. *Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability*. Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems ALS Advances in Life Sciences, **1994**; 117-131

Ceccarelli Nello, Curadi Maurizio, Martelloni Luca, Sbrana Cristiana, Picciarelli Piero, Giovannetti Manuela. *Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant proprieties of artichoke leale and flowers heads two years after field transplant*. Plant soil, **2010**; 335: 331-323

Prasad Arun, Kumar Sanjay, Khaliq Abdul, Pandey Ankit. *Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter yield and chemical composition of volatile oil sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)*. Biol Fertil Soils, **2011**; 47:853-861

Giovannetti M., Avio L., Barale R., Caccarelli N., Cristofani R., Iezzi A., Mignolli., Picciarelli P., Pinto B., Reali D., Sbrana C., Scarpato R. *Nutraceutical value and safety of tomato fruits produced by mycorrhizal plants*. British Journal of Nutrition, **2012**; 107:242-251

Baslam Marouane, Garmendia Idoia, and Goicoechea Nieves. *Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) Improved Growth and Nutritional Quality of Greenhouse-Grown Lettuce*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2011**; 59(10):5504-5515

Fester T., Strack D., Hause G. *Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development*. Planta, **2001**; 213:864-868

Hans J., Hause B., Strack D., Walter M.H. *Cloning characterization, and immunolocalization of mycorrhiza-inducible 1-deoxy-D-Xylulose-5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cell of maize*. Plant physiol, **2004**; 134:614-624

Lhose S., Schkiemann W., Ammer c., Kopka J., Strack D., Fester T. *Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of Medicago truncatula*. Plant Physiol, **2005**; 139:329-340

Fester T., Wray V., Nimtz M., Strack D. *Is stimulation of carotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots a general Phenomenon?* Phytochemistry, **2005**; 66:1781-1786

Gupta ML., Prasad A., Ram M., Kumar S. *Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus Glomus fasciculatum on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (Mentha arvensis) under field condition*. Bioresour, **2002**; 81(1):77-79

Coppetta A., Lingua G., Berta G. *Effects of three Am fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in Ocimum basilicum L. var. Genovese*. Mycorrhiza, **2006**; 16:485-491

Kapoor R., Giri B., Mukerji KG. *mycorrhization of coriander (Coriandrum sativum L.) to enhance the concentrations and quality of essential oil*. J Sci Food, **2002**; 82:339-342

Liu JN, Wu LJ, Wei SL, Xiao X., Su CX, Jiang S, Song ZB, Wang T, Yu ZL. *Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, nutrient uptake and glycyrrhizin production of licorice (Glycyrrhiza uralensis Fish.)*. Plant Growth Regul, **2007**; 52(1):29-39

Rosa-Mera CJD, Ferrara-Cerrato R, Alarcón A, Sánchez-Colín MJ, David OD. *Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium bicarbonate enhance the foliar content of the vinblastine alkaloid in Catharanthus roseus*. Plant Soil, **2011**; 349:367-376

Toussaint JP. *Investigating physiological changes in the aerial parts of Am plants: what do we know and where should we be heading?*. Mycorrhiza, **2007**; 17:349-353

He XL, Li J, Gao AX, Zhao LL, Zao JL. *Effect of different host plant on the development of AM fungi in the rhizosphere of Salvia miltiorrhiza*. J Herbei Univers, **2009**; 29(5):533-537

Meng JJ, He XL. *Effects of Am fungi on growth and nutritional contents of Salvia miltiorrhiza Bge. Under drought stress*. J Agr Univ Herbei, **2011**; 34(1):51-61

Teng HR, He XL. *Effect of different Am fungi and N levels on the flavonoid content of Bupleurium scorzonifolium Willd.* J Shanxi Agr Sci, **2005**; 4:53-54

Zhao JL, He XL. *Effects of Am fungi on drought resistance and content of chemical components of Angelica dahurica*. Acta Agr Bor Occi Sin, **2011**; 20(3):184-189

Zhao JL, Deng HY, He XL. *Effect of AM fungi on the quality of trueborn Angelica dahurica from Hebei province*. Acta Agr Boreali-Sin, **2009**; 24:299-302

Jurkiewicz A, Ryszka P, Anielska T, waligòrki P, Bialonska D, Gòralska K, Michael MT, Turnau K. *Optimization of culture conditions of Arnica montanaL.: effect of mycorrhizal fungi and competing plants*. Mycorrhiza, **2010**; 20:293-306

Nell M, Wawrosh C, Steinkellner S, Vierheiling H, Kopp B, Lössl A, Franz C, Novak J, Zitterl-Eglseer K. *Root solonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpenic acid concentrations in Valeriana officinalisL*. Planta Med, **2010**; 76: 393-398

Zubek S, Mielcarek S, Turnau K. *hypericin and pseudohypericin concentrations of valuable medicinal plant Hypericum perforatum L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi*. Mycorrhiza, **2012**; 22:149-156

Geneva MP, Stancheva IV, Boychinova MM, Mincheva NH, Yonova PA. *Effects off oliar fertilization and arbuscular mycorrhizal colonization of Salvia officinalis L. growth, antioxidant capacity and essential oil composition*. J Sci Food Agr, **2010**; 90:696-702

Ringraziamenti

Prima di tutto vorrei ringraziare le Professoressa Laura e Luisa Pistelli per avermi dato l'opportunità di poter lavorare insieme a loro e per avermi insegnato molto in tutto questo periodo che abbiamo trascorso insieme.

Ringrazio la Professoressa Manuela Giovanetti ed il Dottor Stefano Bedini del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Agro-ambientali con i quali abbiamo collaborato per la realizzazione di questo lavoro di tesi. Grazie per il tempo dedicatomi.

Ringrazio Silvia e Francesca (le dottorande) per il tempo che mi hanno dedicato, per i consigli, per gli aiuti ma soprattutto per avermi sopportato in questi lunghi mesi.

Ringrazio tutti i miei compagni di studi per gli appunti, i consigli e lo studio collettivo... senza di voi alcuni esami sarebbero ancora il mio incubo.

Ringrazio tutti gli amici che mi sono stati vicini in particolar modo le mie splendide amiche Virginia, Silvia e Maria-Laura che nonostante tutto, nonostante tutti ci sono sempre pronte a condividere gioie e dolori, pronte a tirarmi su nei momenti di crisi (perché in questi anni ce ne sono stati molti!), pronte a spronarmi e farmi crescere ogni giorno di più.

Ringrazio anche chi non ha creduto in me e chi non continua a farlo...grazie grazie grazie mi rendete sempre più forte e più consapevole della persona che sono e che voglio diventare.

Infine ringrazio la mia splendida famiglia partendo dai nonni, passando da Giulio (anche se non te lo dico mai ti voglio un'infinità di bene) per terminare con mamma e babbo senza i quali non sarei qui, al raggiungimento di questo traguardo, senza i quali non sarei quella che sono oggi, anche con i miei mille difetti. Grazie... vi devo tutto.